Aus dem Physiologischen Institut der Königlichen Tierärztlichen Hochschule zu Berlin.

Proteolytische und amylolytische Fermente in pflanzlichen Nahrungsmitteln, speziell im Hafer.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER

VETERINÄR-MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

DER

DURCH DIE ORDENTLICHEN PROFESSOREN DER TIERÄRZTLICHEN HOCHSCHULE IN DRESDEN VERSTÄRKTEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT ZU LEIPZIG

VORGELEGT

VON

Paul Klempin
prakt. Tierarzt aus Bromberg
Unterveterinär im 2. Garde-Feldart.-Regiment.

BERLIN 1909
UNIVERSITÄTS-BUCHDRUCKEREI VON GUSTAV SCHADE (OTTO FRANCKE)
LINIENSTRASSE 158.

Gedruckt mit Genehmigung der durch die ordentlichen Professoren der Tierärztlichen Hochschule in Dresden verstärkten medizinischen Fakultät zu Leipzig.

Referent: Herr Geh. Med.-Rat Prof. Dr. **Ellenberger.**

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit und Verehrung

gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546827_0152

Trotz des großen Interesses, das man zu allen Zeiten, besonders aber in den letzten Jahren, der Verdauungsphysiologie entgegengebracht hat, ist doch noch manches Rätsel nicht völlig gelöst worden. Haben die Arbeiten von Pawlow und seinen Schülern unsere Kenntnisse über die Gesetzmäßigkeit und Zweckmäßigkeit der Funktionen der Verdauungsorgane beim Fleischfresser und Menschen wesentlich erweitert, so ist es auf der anderen Seite das Verdienst Ellenbergers und seiner Schule gewesen, uns hochinteressante Tatsachen über die Digestion bei Pflanzenfressern mitgeteilt zu haben.

Gerade der Digestionsapparat der Pflanzenfresser bietet so viel des Eigentümlichen und Charakteristischen, daß es immerhin verwunderlich erscheint, warum ihm nicht schon früher das gleiche Interesse entgegengebracht worden ist wie dem Digestionsapparat der Fleischfresser, der uns in seiner Wirkungsweise bei weitem besser bekannt ist.

Sind uns auch durch die Arbeiten vieler Forscher: Eichhorst, Frick, Ellenberger und Hofmeister, Lehmann, E. Fischer, Claude Bernard, Niebel und so weiter die Darmfermente der Pflanzenfresser sehr gut bekannt, so kommen daneben noch andere Fermente vor, die zum Teil aus den zugeführten Nahrungsmitteln, zum Teil aus der Luft stammen können, und über deren Bedeutung und Mitwirkung bei der Verdauung wir noch nicht genügend unterrichtet sind.

Allein schon das Kapitel der in den Pflanzen vorkommenden Fermente bietet so viel des Interessanten und Neuen, daß es sich wohl der Mühe verlohnt, näher auf die Natur dieser Fermente einzugehen und ihre Rolle, die sie bei der Ausnutzung der Nahrungsmittel spielen, zu studieren.

Proteolytische Pflanzenfermente.

Das Vorkommen stickstoffhaltiger, löslicher Stoffe, die man als Abbauprodukte der Eiweißspaltung durch chemische oder fermentative Wirkung erkannte, in keimenden Pflanzenteilen ist schon frühzeitig entdeckt worden. So fanden zuerst Vauquelin und Robiquet (1) das Asparagin im Spargel und Schulze und Barbieri die Glutaminsäure in Kürbiskeimen. Besonders Schulze (2) und seine Schüler haben viel auf diesem Gebiete geforscht und gearbeitet.

Nachdem es dann später v. Gorup-Besanez (3) gelungen war in gekeimten Wicken auch Leucin nachzuweisen, sowie Schulze, in Lupinenkeimlingen Peptone zu entdecken, erschien es als wahrscheinlich, daß in Pflanzenkeimen neben den schon bekannten diastatischen Fermenten auch proteolytische vorhanden waren. Bald darauf gelang es v. Gorup-Besanez (4) tatsächlich, ein proteolytisches Ferment aus Wickenkeimlingen, ferner aus Hanf-, Leinsamen und Gerste zu isolieren. Green (5) konnte ein proteolytisches Ferment aus keimenden Samen von Lupinus hirsutus isolieren, das aber nur in saurer Lösung wirkte. Ferner wies er das Vorhandensein eines proteolytischen Fermentes in keimenden Samen von Ricinus communis nach. In den ruhenden Samen nimmt er das Vorhandensein eines Zymogens an.

Nachdem nun der Nachweis von dem Vorkommen proteolytischer Fermente in Keimpflanzen und Pflanzensamen geliefert worden war, stellte eine Reihe von Forschern zahlreiche Untersuchungen über das Vorkommen und die Wirksamkeit dieser Enzyme an, die, was ihr Vorhandensein im ruhenden Kerne anbelangt, einander oft widersprechen. Van der Horst (6) isolierte ein Ferment aus den Kotyledonen gekeimter Gerste. In den Blättern einiger Dikotyledonen hat Poehl (7) pepsinähnliche Fermente gefunden. Neumeister (8) konnte die Angaben von Krauch (9) widerlegen, der überhaupt keine Fermente gefunden hatte und daher die Existenz pflanzlicher Enzyme überhaupt leugnet. Allerdings gelang es Neumeister nicht, das Vorkommen von Enzymen in ungekeimten Wicken und Lupinen, das Green (10) nachgewiesen hatte, zu bestätigen. Er ist der Ansicht, daß ungekeimte Samen keine proteolytischen

Fermente enthalten, diese treten vielmehr erst in Keimlingen auf. Die Zuverlässigkeit der Methode Neumeisters — Absorption der Enzyme durch frisches Blutfibrin — wird von Frankfurt (11) angezweifelt. Hansen (12) fand in Wicken kein Enzym. Daccomo und Tommasi (13) entdeckten in Anagallis arvensis ein Enzym. In zahlreichen Pflanzen und Pflanzenteilen, so auch in Wurzeln, Knollen usw. fanden Fermi und Buscaglioni (14) proteolytische Fermente, ferner Soave (15) in Samen, deren Entwickelung durch Äther und Chloroform aufgehoben worden war. Ein fleischauflösendes Ferment soll nach Scheurer-Kestner (16) beim Brotbacken entstehen.

Fernbach und Hubert (17) stellten fest, daß Malzextrakt nach der Filtration durch Chamberlandfilter Gelatine verflüssigt. Das Enzym war durch Alkohol fällbar. Windisch und Schellhorn (18) erzielten ähnliche Resultate mit chloroformversetzten Malzextrakten. Nach Weiß (19) soll durch dieses Ferment außer pflanzlichen Proteinen auch Casein angegriffen werden. Das Enzym verträgt die Erwärmung beim Darren des Malzes und kann daher beim Brauprozeß noch mitwirken.

Butkewitsch (20) fand bei der Selbstzersetzung gekeimter Samen unter Thymolzusatz eine beträchtliche Verminderung des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffes.

Durch diese zahlreichen und ausgedehnten Untersuchungen ist der Nachweis von dem Vorkommen proteolytischer Enzyme in den verschiedensten Pflanzen und Pflanzenteilen geliefert worden.

Aber nicht allein in den höher entwickelten Pflanzen, auch in den niederen Arten der Pflanzenwelt, in den Kryptogamen, kommen proteolytische Fermente vor.

So fanden Poehl (21) in Penicillium, Bourquelot und Herissey (22) in Aspergillus niger und anderen Pilzen Fermente vor. Ein tryptisches Ferment in Pilzen fand Hjort (23). In Schimmelpilzen fand Schäffer (24) proteolytische Fermente.

Ebenso sind auch aus Bakterien proteolytische Fermente dargestellt worden (25): so aus Anthrax von Hankin (26), aus Vibrio Koch (Cholera) von Bitter (27), aus Fäulnisbakterien von Hüfner (28) usw., deren Bedeutung z. B. als Gelatine verflüssigend bekannt ist.

Von den vielen in Pflanzen vorkommenden Enzymen ist ein Enzym besonders häufig Gegenstand der Untersuchungen vieler Forscher gewesen, nämlich das in den Früchten und dem Milchsaft des Melonenbaumes Carica papaya vorkommende „Papayotin" oder „Papain". Dieses Papayotin wurde schon von den Eingeborenen der Antillen und Brasiliens als kulinarisches Hilfsmittel angewendet, um Fleisch mürbe und weich zu machen. Die ältesten Nachrichten hierüber stammen von Griffith Hughes (29) und Browne (30). Von den Forschern, die uns die botanischen Kenntnisse über diese Pflanze geliefert haben, ist in erster Linie Wittmack (31) zu nennen, der sich auch mit der Untersuchung des Fermentes beschäftigte. Es hat dann später eine Reihe von Forschern, so Beckolt, Wurtz, Martin, Harlay, Roßbach, Weeg, Delezenne usw. das Ferment auf seine Wirksamkeit und Eigenschaften hin ausführlich untersucht. Dem Papain ähnliche Fermente sind dann später auch in anderen Pflanzen, so im Safte von Ficus Carica (Wittmack (32)), im Ananassafte (Chittenden (33)) usw. gefunden worden.

Eine wichtige Rolle beim Herbivoren spielen andere Enzyme, die von verschiedenen Forschern genauer untersucht worden sind. An erster Stelle sind Ellenberger und seine Schüler hier zu nennen. In einer Reihe von Arbeiten haben sie das Vorhandensein der Enzyme und die Wirkung und Bedeutung derselben bei der Verdauung betont.

Bereits in seiner ersten Arbeit über das bei der Magenverdauung wirksame amylolytische Ferment macht Ellenberger (34) darauf aufmerksam, daß die Versuche auch die Gegenwart eines proteolytischen Fermentes im Hafer darzutun scheinen. Weitere Versuche von Ellenberger und Hofmeister (35) mit Hafer ergeben: „daß im Hafer ein proteolytisches Ferment vorkommt, welches bei 100 Grad C zerstört wird, und daß in der Luft und im Wasser gar keine oder ein so schwach wirkendes derartiges Ferment enthalten ist, daß dasselbe in einigen Stunden keine nachweisbaren Mengen des in den Körnern enthaltenen Eiweißes zu lösen vermag." Bei Versuchen mit Milchsäure und Salzsäure schien es, als ob die 0,2 prozentige Salzsäure die Fermentwirkung hemme oder aufhebe, was bei Milchsäure von derselben Konzentration nicht der Fall war. Ellenberger

schließt hieraus, daß das proteolytische Haferferment in dieser Richtung dem diastatischen Speichelfermente gleiche. Zum Schluß betonen beide Autoren die praktisch wichtige Bedeutung der Fermente für die Ernährung des Menschen und der Tiere bei Krankheiten der Verdauungsorgane. Ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit der Fermente findet sich in Ellenbergers (36) Handbuch der vergleichenden Histologie und Physiologie.

In Fortsetzung der Arbeiten der beiden Autoren stellten dann Scheunert und Grimmer (37) das Vorkommen proteolytischer Enzyme im Mais, in Pferdebohnen, Lupinen, Buchweizen und Wicken und deren Wirksamkeit bei verschiedener Reaktion fest.

War durch diese Versuche nachgewiesen worden, daß die Enzyme unter den den physiologischen Verhältnissen im Magen und Dünndarm der Herbivoren entsprechenden Bedingungen wirksam waren, so ist es eine andere, nicht minder interessante Frage, ob nun auch die Ausnützung des verabreichten Futters unter Mitwirkung der Enzyme größer ist oder nicht. Es liegen hierüber in der Literatur recht verschiedene Befunde vor.

Weiske (38) hat eine größere Ausnutzung des fermenthaltigen Hafers gegenüber dem fermentfreien bei seinen Fütterungsversuchen an Kaninchen nicht feststellen können. Er kommt demnach zu dem Schlusse, daß „unter normalen Verdauungsverhältnissen im Organismus die Gegenwart von Verdauungsfermenten in der Nahrung keinen Einfluß auf deren bessere Ausnützung ausübt".

Dieses Resultat besagt jedoch wenig. Denn wenn auch der Endeffekt der gleiche in beiden Fällen ist, so ist damit nicht bewiesen, daß doch das Enzym bei der Ausnutzung mitwirkte und so eine Ersparnis an enzymhaltigen Verdauungssäften eintreten konnte, was z. B. bei Krankheiten der Digestionsorgane von großem Werte wäre.

Im Gegensatz zu Weiske gelang es Bergman (39), auf Grund seiner Versuche eine größere Ausnutzung des fermentreichen Futtermittels festzustellen. Da Hafer als leicht verdaulich zu bezeichnen ist und ausgehend von der Voraussetzung, daß, je leichter verdaulich ein Futterstoff ist, um so weniger die Elimination eines der bei der Verdauung wirksamen Faktoren sich bemerkbar machen wird, nahm Bergman Fütterungsversuche

mit Heu und Stroh vor. Beim Heuversuch zeigte sich, „daß durch die Erhitzung die Ausnützung der Proteinstoffe und der N-freien Extraktstoffe nicht unbedeutend vermindert, die Ausnützung der Pentosane und der Rohfaser dagegen gesteigert wurde."

Der Fütterungsversuch mit Stroh ergab im wesentlichen dasselbe Resultat. Schon Hornberger (40) teilt mit, daß durch „Dämpfen" die stickstoffhaltigen Bestandteile des Wiesenheues schwerer verdaulich werden. Es werden die Enzyme vernichtet.

Ferner nimmt Bergman Versuche in vitro vor und zeigt, daß Heu auch hier verdaut wird. Zum Heu zugesetztes Fibrin wird nicht verdaut. Bergman meint deshalb, „daß dieses Enzym nur intrazellulär wirkt und nicht aus den Zellen diffundiert."

Versuche mit Pepsin und Pankreatin ergeben: Durch Erhitzen sind die Eiweißkörper für Pepsin-Salzsäure schwerer verdaulich. Die Ursache ist zum Teil in der Vernichtung der proteolytischen Enzyme zu suchen.

Wenngleich auch Bergman ein positives Resultat bei seinen Versuchen erhalten hat, so ist damit auch noch nicht viel bewiesen. Denn wie Ellenberger (41) betont, kann die Ausnützung einer fermenthaltigen und einer fermentfreien Nahrung sehr wohl dieselbe sein, ohne daß der Ablauf der Verdauungsvorgänge der gleiche wäre. Es tritt dann eben bei fermentfreier Nahrung die Darmverdauung kompensatorisch für die geringere Magenverdauung ein. Also die Enzyme der in den Darmkanal ergossenen Verdauungssäfte leisten dann die Arbeit, die unter Umständen die Nahrungsmittelenzyme geleistet haben würden.

In weiterer Folge dieser Arbeiten hat dann Grimmer (42) mehrere unserer wichtigsten Futtermittel, so Pferdebohnen, Wicken, Hafer und Gerste, untersucht und die Frage nach der Dauer, Zeit und der Art der Reaktion gelöst.

Pferdebohnen- und Wickenfermente wirken am besten in saurer Lösung, das Gerstenenzym ist scheinbar unabhängig von der Reaktion. Es wirkt überall sehr gut. Grimmer nimmt mehr als ein Enzym in den Wicken an, und zwar wird das tryptisch wirkende Enzym durch den Alkaligehalt des Speichels vernichtet und scheidet somit als wirksames Agens bei der Magenverdauung aus. Bemerkenswert ist ferner, daß die Enzyme in den Pferde-

bohnen, im Hafer und in der Gerste sehr schnell wirken und dadurch der Hauptbedingung entsprechen, die an ein Enzym zu stellen ist, wenn es bei der Verdauung eine bedeutende Rolle spielen soll.

Von Interesse erschien es nun, zu untersuchen, wie weit die beschriebenen Nahrungsmittelfermente für die Verdauung Bedeutung gewinnen können. Um hierüber Aufklärung zu erhalten, sollte ganz systematisch die Wirkung der Fermente unter den Bedingungen studiert werden, die im Tierkörper während der einzelnen Phasen der Verdauungsvorgänge herrschen. Nachdem zuerst bestimmt worden war, wie groß die eiweißspaltende Kraft der eingeführten Enzymmengen werden kann, und wie sie durch die Reaktion der Verdauungsflüssigkeit und die Zeitdauer der Einwirkung beeinflußt wird, habe ich mein Hauptaugenmerk darauf gerichtet, festzustellen, ob die eiweißspaltende Wirkung der Nahrungsmittelenzyme überhaupt neben der der eiweißspaltenden Fermente des Magen- und Darmkanals noch zur Geltung kommen kann, und weiter, wie sich die Nahrungsmittelenzyme anderen Eiweißkörpern gegenüber verhalten, die sich gleichzeitig im Nahrungsmittelbrei befinden, ob und bis zu welchem Grade sie diese anzugreifen vermögen.

Als Versuchsobjekt diente bei diesen Versuchen in erster Linie der Hafer, weil dieser Samen bei unserem wertvollsten Haustiere, dem Pferde, als wichtigstes eiweißlieferndes Futtermittel verwandt wird. Vergleichsweise, allerdings nur etwas kursorisch, habe ich die Fermente der Gerste und der Wicken untersucht.

Methodik.

Bei meinen Studien kam es darauf an, die proteolytische Kraft der Fermente zu messen. Ein absolutes Maß dafür besitzen wir nicht. Jede als Maßstab für die Größe der stattgehabten Verdauung benutzte Reaktion ist eigentlich mehr oder minder willkürlich gewählt. Eine Vorstellung von der Größe der Verdauung wird uns z. B. die Menge der gebildeten niederen stickstoffhaltigen Produkte geben (43). Um diese niederen N-haltigen Stoffe, die durch den Verdauungsprozeß entstehen, von den höheren, fällbaren zu trennen, habe ich mich nicht der recht umständlichen und nicht besonders zuverlässigen Hitzekoagulation in schwach essig-

saurer Lösung mit Na Cl-Zusatz, sondern einer kürzlich von Michaelis und Rona angegebenen Enteiweißungsmethode (44) bedient. Diese Methode ist von den genanntenAutoren speziell zum Enteiweißen von Blutserum angewandt worden. Es ist aber leicht, sie so zu modifizieren, daß sie auch beim Enteiweißen der hier vorliegenden Lösungen ganz vorzügliche Dienste leistet. Man muß einmal versucht haben, in solchen dickbreiigen Massen, wie sie bei diesen Versuchen erhalten wurden, eine quantitative Ausfällung des koagulablen Eiweißes vorzunehmen, um beurteilen zu können, welchen Fortschritt die obengenannte Enteiweißungsmethode bedeutet.

In den untersuchten Samen, Eiweißkörpern usw. wurde die Menge des von vornherein vorhandenen, mit Mastix nicht fällbaren Stickstoffs und in einer Parallelprobe die Menge des nach der Wirksamkeit des Fermentes vorhandenen nicht fällbaren Stickstoffs ermittelt. Es wurde also bestimmt, wieviel von den vorher mit Mastix fällbaren N-haltigen Verbindungen durch die Fermente in nicht mehr fällbare Abbauprodukte (kurz als „löslicher N" bezeichnet) übergeführt worden ist. Die Zunahme an löslichem N kann man als ein sicheres Zeichen dafür auffassen, daß das untersuchte Ferment eine proteolytische Wirkung entfaltet hat, und die Größe der Zunahme an löslichem N wird uns auch einen zahlenmäßigen Ausdruck für die Kraft des Fermentes liefern können. Es ist zwar bekannt, daß ein Teil der Albumosen zusammen mit den Eiweißkörpern im eigentlichen Sinne bei der Mastixfällung niedergeschlagen wird (45), und da wir den löslichen N als „verdaut" bezeichnen wollen, müssen wir den fällbaren Teil der Albumosen mit als „unverdaut" in Rechnung bringen. In diesem Falle war das Verfahren statthaft, da hier doch nur vergleichbare Werte gewonnen werden sollten, und das sind meine Zahlen vollkommen, da ich bei der Enteiweißung jedesmal genau die gleichen Bedingungen innegehalten habe, wie das unten ausführlicher geschildert wird. Daß ich auf die Bestimmung des fällbaren Bruchteils der Albumosen verzichtet und diese der Einfachheit halber jedesmal zum unverdauten N gerechnet habe, kann ja niemals die Richtung der Versuchsresultate beeinflussen, sondern höchstens ein wenig die quantitative Beurteilung der Fermentwirkungen zu meinen Ungunsten, indem eben ein kon-

stanter Teil der höchsten Spaltprodukte noch dem unangegriffenen Eiweiß zugerechnet wird. Physiologisch ließe sich das vielleicht auch dadurch begründen, daß ja nur die tieferen — unter keinen Umständen mit Mastix fällbaren — N-haltigen Spaltprodukte der Eiweißkörper resorbiert werden und am Stoffwechsel teilnehmen können.

Im einzelnen gestaltete sich der **Gang der Untersuchung** folgendermaßen:

Es wurden 30 g der betreffenden Getreideart (Hafer, Wicken usw.) mit der zehnfachen Menge Flüssigkeit versetzt. Sollte das Enzym getötet werden, so wurden 300 ccm kochenden Wassers auf das Getreide gegossen und dieses dann noch eine halbe Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt. Nachdem die Kolben abgekühlt waren, wurden die erforderlichen Mengen Pepsin, Trypsin, Glyzerinextrakt, anderer Eiweißkörper, ferner Salzsäure oder Sodalösung in entsprechenden Mengen zugegeben, wieder auf das ursprüngliche Volumen (300 ccm) aufgefüllt und schließlich sämtliche Kolben mit 20 ccm Toluol versetzt. Dann wurden die Kolben in den Brutschrank gestellt, wo sie bestimmte Zeiten verblieben. Nach der Herausnahme aus dem Brutschrank, der ständig eine Temperatur zwischen 38 bis 40 Grad aufwies, wurden die Kolben — sofern nichts anderes bemerkt ist — in einem Wasserbade ca. eine halbe Stunde gekocht, vor allem, um die wirksamen Fermente abzutöten, dann aber auch, weil die Erfahrung gelehrt hatte, daß sich das Eiweiß bei der angewandten Methode besser ausfällen ließ, wenn es vorher gekocht worden war.

Jetzt wurde jeder Erlenmeyer-Kolben nach dem Wiedererkalten mit 300 ccm 96 prozentigen Alkohols versetzt und so schon ein großer Teil des Eiweißes koaguliert. Nach Verlauf von ½ bis 1 Stunde wurde die Flüssigkeit vermittels eines Strumpfes aus Koliertuch von den festen, gröberen Rückständen der Samen abgeseiht, diese kräftig ausgepreßt und dann mehrmals mit 50 prozentigem Alkohol ausgewaschen. Die Kolatur, ca. 800 ccm, wurde in einen Maßkolben von 2 l Inhalt gefüllt, hier mit 100 ccm einer konzentrierten, alkoholischen Mastixlösung versetzt, gut durchgemischt und mit etwa 1000 bis 1100 ccm Wasser verdünnt. Bei dieser starken Verdünnung fiel dann der Mastix, der vorhin noch ziemlich in Lösung geblieben war, gänzlich aus, und eine Emulsion von milchartigem Aussehen entstand. Die Flüssigkeit wurde schließlich noch mit 30 bis 40 ccm einer konzentrierten Kupfersulfatfösung versetzt und, falls sie alkalisch oder neutral war, mit Essigsäure schwach angesäuert. Jetzt fiel der Mastix in feinen Flocken aus, das vorhandene koagulable Eiweiß mit sich reißend. Diese Suspension wurde in dem Maßkolben, in dem sie sich ja befand, auf 2000 ccm aufgefüllt und gut durchschüttelt. Nach mehrstündigem Stehen wurde durch einen dichten Wattepfropf abfiltriert und in je 700 oder 800 ccm des klaren Filtrates der Stickstoff nach K j e l d a h l bestimmt. Die angegebenen Zahlen sind stets Mittelwerte aus zwei Doppelbestimmungen. Die wichtigsten Versuche wurden mehrfach angestellt und zeigten im Endresultat befriedigende Übereinstimmung (Fehler von ca. 6 bis 8 Prozent vom Werte).

Das Prinzip der Versuchsanordnung war immer kurz folgendes:

Erster Kolben: Hafer + Lösungsmittel, gekocht, x Stunden im Brutschrank, dann wieder gekocht: ergibt den vorhandenen löslichen N.

Zweiter Kolben: Hafer + Lösungsmittel, ungekocht, x Stunden im Brutschrank, dann gekocht, ergibt den vorhandenen löslichen N, vermehrt um den durch das Enzym des Hafers gelösten N.

Genau nach dem gleichen Schema wurden auch die Versuche unter Zusatz der anderen Fermente (Trypsin, Pepsin usw.) ausgeführt. Die zusammengehörigen Versuche wurden möglichst nebeneinander angesetzt und behandelt.

Wirkungsgrad der Fermente.

Zuerst habe ich mich über die Wirkungsgröße der in den Futtermitteln vorhandenen Enzyme orientiert, sowie den Einfluß der Zeitdauer und der Reaktion studiert.

Tabelle 1.

30 g Hafer enthalten 397,5 mg N (= 1,325 %); 30 g Gerste enthalten 525,84 mg N (= 1,7528 %); 30 g Wicken enthalten 1339,1 mg N (=4,464 %).

	Futter-Mittel	Reaktion	Zeit	Löslicher Stickstoff			Also durch das Enzym gelöster Stickstoff		
				im gekochten Getreide		im rohen Getreide Enzym wirkend			
			Stdn.	mg	%	mg	mg	% vom Gesamt-stick-stoff	% vom unlös-lichen Stick-stoff
1.	Hafer	0,25 % HCl	24	68,8	19,07	107,0	38,2	9,61	11,63
2.	Hafer	Neutral	24	35,6	8,96	72,8	37,2	9,36	10,28
3.	Hafer	0,25 % Sodalsg.	24	32,0	8,05	58,0	26,0	6,54	7,11
4.	Gerste	0,3 % HCl	24	91,2	17,34	160,8	69,6	13,24	16,01
5.	Wicken	0,5 % HCl	12	419,2	31,3	460,4	41,2	3,08	4,48

Tabelle 2.

30 g Hafer enthalten 397,5 mg Stickstoff.

	Reaktion	Zeit	Löslicher Stickstoff		Durch das Enzym gelöster Stickstoff
			Hafer gekocht	Hafer roh, Enzym wirkend	
		Stdn.	mg	mg	mg
1.*)	0,25 % HCl	24	68,8	107,0	38,2
2.*)	0,3 % -	24	78,8	112,8	34,0
3a.*)	0,5 % HCl	6	88,8	123,2	34,4
3b.*)	0,5 % -	12	99,2	132,8	33,6
3c.*)	0.5 % -	24	104,8	137.6	32,8
4.*)	0,6 % HCl	24	88,8	127,6	38,8
5.*)	0,8 % -	24	110,4	140,8	30,4
6.†)	0,5 % HCl	24	53,6	82,4	28,8
7.†)	3,0 % -	24	74,8	97,6	22,8
8.†)	6,0 % -	24	148,0	152,0	4,0

Die Versuche in den Tabellen 1 und 2 zeigen deutlich, daß das Haferferment bei jeder Reaktion einen allerdings nicht gerade

*) Am Schluß des Versuches gekocht.
†) Am Schluß des Versuches nicht gekocht.

großen Teil des vorhandenen Eiweißes spaltet. Die Versuchsdauer scheint innerhalb der gewählten Zeitstufen ohne Einfluß auf den erzielten Grad der Einwirkung zu sein. Nach 24 Stunden ist nicht mehr durch das Ferment gelöst worden als nach sechs Stunden. Dagegen nimmt durch die Dauer der Mazeration mit 0,5% H Cl die Menge des löslichen Stickstoffes von 6 bis 24 Stunden stetig, wenn auch nicht viel, zu. Wie wir beim Haferenzym weiter sehen, ist dieses bei saurer Reaktion am wirksamsten, etwas weniger in neutraler — jedoch wird hier vielleicht während der fortschreitenden Verdauung infolge gebildeter organischer Säuren noch eine gewisse Azidität erreicht; in alkalischer Lösung ist dagegen der Angriff des Eiweißes erheblich geringer. Bei steigenden Säurekonzentrationen — über 0,5%, die aber praktisch belanglos sind — tritt dann wieder deutlich eine Hemmung der Enzymwirkung ein. Dies wird besonders deutlich bei denjenigen Versuchen, die am Schlusse nicht wie die anderen noch einmal gekocht wurden, um das Ferment zu töten. Das erscheint auch richtiger; denn sonst kann ja durch die Wirkung der kochenden Salzsäure in stärkerer Konzentration eine Eiweißspaltung hervorgerufen werden, die als Fermentwirkung erscheinen könnte. Daß das Töten der Fermente durch Kochen bei geringer Salzsäurekonzentration keine nennenswerten Fehler bedingt, zeigt ein Vergleich der Endresultate der Versuche 3c und 6, Tabelle 2.

Die auf diese Weise vom Ferment gelösten Eiweißmengen sind eigentlich recht gering. Man kann daran denken, worauf schon Ellenberger und Grimmer hingewiesen haben, daß die entstehenden Abbauprodukte hemmend auf den Fermentprozeß einwirken und so im Reagenzglasversuch die Wirkung des Fermentes zum Stillstand bringen. Im Tierkörper werden aber diese Abbauprodukte durch die Resorption fortgeschafft, und es wäre möglich, daß nach Entfernung der hemmenden Abbauprodukte aus der Lösung der Verdauungsprozeß ein tiefergehender ist. Die Verdauungsprodukte, soweit sie dialysabel sind, können wir ebenfalls entfernen, und es schien interessant, zu untersuchen, ob unter diesen Verhältnissen ein größerer Angriff des Eiweißes durch das Ferment erzielt werden kann.

Dazu diente folgende Versuchsanordnung:

In einem Dialysator wurden 30 g des betreffenden Futtermittels mit 300 ccm 0,5 prozentiger Salzsäure gefüllt. In das äußere Gefäß kamen etwa 500 ccm einer gleichfalls 0,5 prozentigen Salzsäure, innere und äußere Flüssigkeit wurden mit

Toluol versetzt. Der Dialysator wurde dann mit einem Deckel versehen in den Brutschrank gesetzt, wo er im ganzen 12 Stunden blieb, aber alle 2 Stunden zum Wechsel der Außenflüssigkeit herausgenommen wurde. Dieser also im ganzen fünfmal vorgenommene Wechsel wurde derart ausgeführt, daß die äußere Flüssigkeit, die die dialysierten Produkte enthielt, abgegossen und durch eine gleiche, auf Brutschranktemperatur gebrachte Menge 0,5 prozentiger Salzsäure wieder ersetzt wurde. Nach Zusatz von Toluol wurde der Dialysator mit der frischen Außenflüssigkeit in den Brutschrank zurückgestellt. Die bei jedem Wechsel abgegossenen äußeren Flüssigkeiten wurden sogleich mit etwas Schwefelsäure versetzt und auf dem Wasserbade zusammen eingedampft. Nach Beendigung des ganzen Versuches wurde der Inhalt des inneren Gefäßes wie gewöhnlich behandelt, d. h. nach Umfüllung in einen Kolben wurde das Enzym durch ½ stündiges Kochen getötet und das Eiweiß wie üblich mit Mastix gefällt. Die gesammelten äußeren Flüssigkeiten des Dialysators wurden wie oben beschrieben zusammen bis auf etwa 300 ccm eingedampft und dann nach Überspülung in einen Maßkolben auf 500 ccm aufgefüllt; in je 200 ccm dieser Lösung wurde dann der Stickstoff nach K j e l d a h l bestimmt.

Tabelle 3.

30 g Hafer enthalten 397,5 mg N; 30 g Wicken enthalten 1339,1 mg N.

	Futtermittel	Reaktion % Salzsäure	Zeit Stdn.	Getreide gek., lösl. Stickstoff: Undialysabler Stickstoff mg	Getreide gek., lösl. Stickstoff: Dialysabler Stickstoff mg	Sa. des Stickstoffs mg	Getreide roh, Enzym wirkend: Undialysabler Stickstoff mg	Getreide roh, Enzym wirkend: Dialysabler Stickstoff mg	Sa. des Stickstoffs mg	Sonst durch das Getreideenzym löslicher Stickstoff mg	Jetzt durch das Getreideenzym löslicher Stickstoff mg
1.	Hafer	0,5	12	91,15	8,05	99,20	132,1	16,8	148,9	32,6	48,7
2.	Wicken	0,5	12	375,2	44,0	419,2	390,4	108,5	498,9	41,2	79,7

Das Resultat dieser Versuche gibt Tabelle 3 wieder. Im Hafer ist bei Fortschaffung der dialysablen Verdauungsprodukte die Zunahme an nicht koagulablem Stickstoff nur gering. Bei den Wicken ist sie beträchtlicher; sie hat sich fast verdoppelt. Für dieses Nahrungsmittel dürfte man es daher wohl auf Grund dieser Versuche als wahrscheinlich betrachten, daß die Wirkung des proteolytischen Enzyms im Tierkörper bei ständiger Resorption der Verdauungsprodukte größer ist, als sie in vitro festgestellt worden ist.

Wirkung der Nahrungsmittelfermente bei der Verdauung.

Um systematisch weiter zu untersuchen, müßte jetzt festgestellt werden, wie die einzelnen Phasen der Verdauung im Tierkörper diese eben festgestellten Fermentwirkungen beeinflussen. Der Vollständigkeit halber wurde mit dem Speichel begonnen, weil

es ja immerhin denkbar wäre, daß dieser die Wirkung des Haferfermentes beeinträchtigt. Die Versuche (Tabelle 4) zeigen, daß das nicht der Fall ist. Ja, es findet sich nach Zusatz des Speichels

Tabelle 4.

Futtermittel	Zeit	Speichel getötet	Speichel wirkend	Sonst durch das Haferenzym gelöster Stickstoff	Jetzt durch das Haferenzym gelöster Stickstoff
	Stdn.			mg	mg
30 g Hafer gekocht . . .	24	73,6	81,6	—	—
30 g Hafer roh, Enz. wirk.	24	126,36	120,8	26,0	45,4

sogar mehr löslicher Stickstoff als sonst. Dies haben wir aber nicht etwa als eine Wirkung des Ptyalins aufzufassen, was schon daraus hervorgeht, daß Zusatz getöteten Speichels dieselbe Wirkung zeitigt, sondern vielmehr so zu deuten, daß unser Haferferment noch einen Teil der mit dem Speichel zugesetzten Eiweißsubstanzen (Mucin) angegriffen hat, Verhältnisse, auf die nachher noch näher eingegangen werden muß.

Am interessantesten ist jetzt die Frage: Wie verhält sich das Haferferment im Magen, in salzsaurer Lösung? Denn hier ist ja die Wirkung des Haferferments am stärksten. Es fragt sich vor allem, ob bei der Einwirkung des Pepsins auf Hafer die Wirkung des darin enthaltenen proteolytischen Enzyms noch zur Geltung kommt, ob also roher enzymhaltiger Hafer von gleichen Pepsinmengen leichter und weitergehend verdaut wird als gekochter Hafer, in dem das Enzym getötet ist. Das ist um so bedeutungsvoller, als ja sonst rohe Eiweißstoffe für Fermente meist schwerer angreifbar sind als gekochte*). In diesen Versuchen, wie sie Tabelle

Tabelle 5.

30 g Hafer enthalten 397,5 mg N.

	Reaktion	Zeit	Löslicher Stickstoff		Also durch das Enzym gelöster Stickstoff	Lösl. Stickstoff		Also durch das Haferenzym trotz Gegenwart des Pepsins 1 g gelöster Stickstoff
			Hafer **gekocht**	Hafer **roh**, Enzym wirkend		Hafer **gekocht**, 1 g Pepsin	Hafer **roh**, Enzym wirkend, 1 g Pepsin	
	% HCl	Stdn.	mg	mg	mg	mg	mg	mg
1.	0,5	6	88,8	123,2	34,4	222,4	266,4	44,0
2.	0,5	12	99,2	132,8	33,6	—	—	—
3.	0,5	24	104,8	137,6	32,8	282,4	294,4	12,0

*) Oppenheimer und Aron, l. c.

Tabelle 6.

	Reaktion	Zeit	Löslicher Stickstoff		Also mehr gelöst durch das Haferenzym trotz Gegenwart von Pepsin 2 g	Lösl. Stickstoff		Also mehr gelöst durch das Haferenzym trotz Gegenwart von Pepsin 4 g
			Hafer **gekocht**, 2 g Pepsin	Hafer **roh**, Enzym wirkend, 2 g Pepsin		Hafer **gekocht**, 4 g Pepsin	Hafer **roh**, Enzym wirkend, 4 g Pepsin	
	% HCl	Stdn.	mg	mg	mg	mg	mg	mg
1.†)	0,5	10	188,0	224,4	**36,4**	207,2	232,8	**25,6**
2.	0,5	24	289,6	290,4	**0,8**	292,8	293,6	**0,8**

5 und 6 wiedergeben, ließ ich kleine und größere Fermentmengen wechselnde Zeiten einwirken. Die proteolytische Kraft des Haferenzyms kommt neben der des Pepsins vor allem dann zur Geltung, wenn geringe Pepsinmengen kurze Zeiten wirken. Die Verstärkung, welche die Pepsinverdauung durch die Wirkung des Haferenzyms erfährt, spricht sich hauptsächlich darin aus, daß dieselben Wirkungen erheblich schneller erreicht werden als ohne Beihilfe des Haferenzyms. So konnte in dem Versuch mit 1 g Pepsin und sechsstündiger Dauer das Haferenzym seine volle eiweißspaltende Kraft neben der des Pepsins entfalten. Werden die Pepsinmengen höher, vor allem läßt man das Pepsin längere Zeit, 24 Stunden, tätig sein, so tritt die Wirkung des Haferenzyms zurück, die Verdauung durch das Pepsin erreicht jetzt bei dem gekochten Hafer fast den gleichen Grad wie beim rohen. Aber gerade die zuerst skizzierten Verhältnisse, kurz dauernde Wirkung und geringe Fermentmengen, liegen für die Verdauung des Hafers beim Pferde vor. In dem kleinen Magen dieses Tieres, der ja nicht einmal eine volle Mahlzeit, also nicht $^1/_3$ der Tagesration zu fassen vermag, ist die Mischung mit den Verdauungssäften nur unvollständig, und der Speisebrei rückt schnell in die tieferen Abschnitte des Verdauungstraktus vor. Hier ist also eine Mitwirkung des Haferenzyms, wie sie sich in meinen Versuchen ausspricht, sehr wohl denkbar und kann für den Grad des erzielten Abbaus von Bedeutung werden. In noch schönerem Maße wird das — worauf schon Ellenberger hingewiesen hat — unter pathologischen Verhältnissen, bei welchen die Pepsinabsonderung geringer ist, der Fall sein. Vom Trypsin wird ganz analog wie vom Pepsin, wie eine weitere Versuchsreihe zeigt, mehr Stickstoff bei Einwirkung auf rohen als bei Einwirkung auf ge-

†) Versuch 1 ist nach dem Herausnehmen aus dem Brutschrank nicht gekocht worden.

Tabelle 7.

Reaktion % Sodalösung	Zeit Stdn.	Löslicher Stickstoff: Hafer gekocht mg	Löslicher Stickstoff: Hafer roh, Enzym wirkend mg	Also durch das Enzym gelöster Stickstoff mg	Löslicher Stickstoff: Hafer gekocht, 1 g Trypsin mg	Löslicher Stickstoff: Hafer roh, Enzym wirkend 1 g Trypsin mg	Also durch das Haferenzym trotz Gegenwart des Trypsins gel. Stickstoff mg
0,5	24	21,6	41,16	19,56	56,4	77,1	20,7

kochten Hafer in Lösung gebracht. Das Haferferment kann also auch neben dem Trypsin zur Geltung kommen, allerdings nur in geringerem Maße entsprechend seiner schwächeren Wirksamkeit in alkalischer Lösung.

Wirkung des Haferfermentes auf verschiedene Eiweißkörper.

Am interessantesten erschien es nun, festzustellen, ob mit den eben kennen gelernten Leistungen die Kraft des Haferfermentes erschöpft ist oder ob vielleicht noch wirksames Ferment in dem Hafer enthalten ist, das aber nur das Hafereiweiß aus irgendeinem Grunde nicht weiter anzugreifen vermag. Es würde sich also fragen, ob das Ferment außer dem eigenen Eiweiß des Nahrungsmittels, in dem es enthalten ist, noch andere gleichzeitig in der Lösung vorhandene Eiweißstoffe verdauen kann. Eine ähnliche Frage hat schon einmal Bergman einer experimentellen Prüfung unterzogen, indem er das proteolytische Ferment des Heues auf Fibrinflocken wirken ließ; er konnte aber keine fibrinverdauende Wirkung konstatieren und schloß daraus, daß wahrscheinlich die Nahrungsmittelenzyme nur intrazellulär wirksam seien.

Um auch bei diesen Untersuchungen planmäßig zu Werke zu gehen, habe ich erst einmal den Hafer auf eine neue Menge Hafereiweiß, von dem wir bereits wissen, daß es für das Ferment angreifbar ist, wirken lassen. Dieser Versuch wurde so angeordnet, daß zu 15 g rohem Hafer noch 15 g gekochter Hafer (resp. zu 7,5 g noch 22,5 g) gesetzt wurden. Wir kennen die aus 15 g gekochten Hafers zu erwartende Menge löslichen Stickstoffes und kennen ebenso die in 15 g rohen Hafers vorhandene Menge löslichen und durch das Ferment löslich gemachten Stickstoffes. Ist die Menge des inkoagulablen Stickstoffes größer geworden, so muß das in den 15 g rohen Hafers enthaltene Ferment — da es ja erfahrungsgemäß von dessen Eiweiß nichts mehr lösen kann — das Eiweiß des

gekochten Hafers angegriffen haben. Die Versuche 1—4 der Tabelle 8 zeigen, daß ein solcher Angriff zweifellos stattgefunden hat, und zwar, ganz entsprechend allem was wir jetzt von dem Ferment wissen, daß der stärkste Angriff in saurer, ein nur wenig geringerer in neutraler, ein erheblich schwächerer in alkalischer Lösung zu

Tabelle 8.

	Auf	wirken	Reaktion	Zeit	Löslicher Stickstoff		Sa. des Stickstoffes	Gefundener löslicher Stickstoff	Also vom zugesetzten Eiweiß noch gelöst durch dae Enzym
					im rohen Hafer, Enzym wirkend	im zugesetzten gekochten Samen			
				Std.	mg	mg	mg	mg	mg
1.	15 g Hafer gek.	15 g Hafer roh	0,25 % HCl	24	53,5	34,4	87,9	100,8	12,9
2.	15 g - -	15 g - -	0,25% Sodalg.	24	29,0	16,0	45,0	47,2	2,2
3.	15 g - -	15 g - -	Neutral	24	36.4	17,8	54,2	64,0	9,8
4.	22,5 g - -	7,5 g - -	Neutral	24	18,2	26,7	44,9	50,4	5,5
5.	15g Wicken gek.	15 g Hafer roh	Neutral	24	36,4	86,8	123,2	153,2	30,5
6.	15 g - -	15 g - -	0,5 % HCl	12	66,4	209,6	276,0	293,2	17,2
7.	15 g Gerste gek.	15 g Hafer roh	Neutral	24	36,4	17,6	54,0	75,6	21,6
8.	15 g - -	15 g - -	0,3 % HCl	24	56,4	45,6	102,0	118,4	16,4

konstatieren ist. Dieser Versuch scheint einwandfrei dafür zu sprechen, daß in einer Haferlösung noch stets wirksames Ferment vorhanden ist, daß dieses aber von dem Eiweiß des Hafers nur einen gewissen Prozentsatz in lösliche Form überzuführen vermag. Geben wir nun frisches Hafereiweiß, das noch nicht bis zu dieser Grenze angegriffen ist, in Form gekochten Hafers hinzu, so wird das vorhandene wirkungsfähige Ferment dieses jetzt ebenfalls angreifen. Für die Richtigkeit der Auffassung, daß das Haferferment das Hafereiweiß nur bis zu einer gewissen Grenze anzugreifen imstande ist, werden später noch weitere Beweise beigebracht werden können.

Nachdem durch diese Versuche mit Sicherheit festgestellt worden war, daß im Hafer noch proteolytisches, für das Hafereiweiß selbst wirksames Ferment vorhanden ist, mußte ich weiterhin prüfen, welche Arten von Eiweißkörpern dieser noch wirkungsfähige Fermentanteil anzugreifen vermag. Zunächst wurden andere Pflanzeneiweißarten gewählt, von denen bekannt war, daß sie ebenfalls von proteolytischen Pflanzenfermenten angegriffen

werden. Ich ließ das Haferferment neben Hafer noch auf gekochte Wicken und gekochte Gerste wirken (Versuch 5 bis 8, Tabelle 8), das Gerstenferment neben Gerste noch auf gekochten Hafer wirken und konstatierte, daß sowohl das Haferferment das Eiweiß der zugesetzten gekochten Wicken und Gerste (Versuch 5 bis 8, Tabelle 8) als auch das Gerstenferment das Eiweiß des zugesetzten gekochten Hafers zu verdauen vermag (Versuch 1 und 2, Tabelle 9).

Tabelle 9.

30 g Gerste enthalten 525,84 mg N; 30 g Hafer enthalten 397,5 mg N.

	Futtermittel	Reaktion	Zeit	Löslicher Stickstoff im rohen Eiweiß, Enzym wirkend		Löslicher Stickstoff im gekochten Eiweiß		Summa des löslichen Stickstoffes	Gefundener löslicher Stickstoff	Also ist an Stickstoff mehr gelöst durch das Enzym
				Gerste	Hafer	Gerste	Hafer			
		HCl	Std.	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
1.	15 g Gerste gekocht, 15 g Hafer roh, Hafer-Enzym wirkend	0,3 %	24	—	56,4	45,6	—	102,0	118,4	16,4
2.	15 g Gerste roh, Gerste-enzym wirkend 15 g Hafer gekocht	0,3 %	24	80,4	—	—	38,4	118,8	132,0	13,2
5.	15 g Gerste roh, 15 g Hafer roh, beide Enzyme wirkend	0,3 %	24	80,4	56,4	—	—	136,8	130,4	—

Um die Richtigkeit der Versuchsanordnungen und der Berechnungen zu kontrollieren, habe ich noch (Versuch 3 der Tabelle 9) gleiche Teile rohen Hafers und roher Gerste aufeinander einwirken lassen. Die gefundene Menge löslichen N entspricht innerhalb der Fehlergrenze gut der aus den Einzelversuchen berechneten Menge. Der Versuch liefert aber damit auch einen neuen Beweis dafür, daß beide Fermente, das des Hafers und das der Gerste, trotz ihrer eben erwiesenen Wirkungsfähigkeit doch das Pflanzeneiweiß nur bis zu einer bestimmten, gleichen Grenze anzugreifen vermögen. So kommt es auch, daß das Gerstenferment allein in dem Gemisch von Gerste und Hafer fast eine ebenso große Wirkung entfaltet wie beide Fermente zusammen; die Spaltung überschreitet eben eine gewisse Grenze nicht.

Bei der Untersuchung weiterer Eiweißkörper auf ihre Angreifbarkeit durch das Haferferment bin ich vorerst noch beim

Pflanzeneiweiß geblieben und habe zwei käufliche Präparate, „Roborat“ und „Lactagol“, der Verdauung durch das Ferment unterworfen. Wie der Versuch 1 und 2 der Tabelle 10 zeigt, vermag das Haferferment noch einen beträchtlichen Teil des N dieser

Tabelle 10.

Roborat*): 1365,0 mg N; Lactagol*): 1335,6 mg N; Plasmon*): 1013,3 mg N; Casein*): 1129,24 mg N; Milch*): 51,8 mg N.

	Futtermittel	Reaktion	Zeit Stdn.	Löslicher Stickstoff im fremden Eiweiß mg	Löslicher Stickstoff im rohen Hafer, Enzym wirkend mg	Summa des löslichen Stickstoffs mg	Gefundener löslicher Stickstoff mg	Also vom zugesetzten fremden Eiweiß durch das Hafer-enzym verdaut mg N
1a.	Roborat, gekocht .	Neutral	24	94,4	66,4	160,8	213,8	53,0
1b.	- roh . . .	-	24	95,2	66,4	161,6	204,0	42,0
2a.	Lactagol, gekocht .	-	24	41,6	66,4	108,0	140,0	32,0
2b.	- roh . . .	-	24	38,8	66,4	105,2	109,6	?
3a.	Plasmon, gekocht .	-	24	55,3	66,4	121,7	312,8	191,1
3b.	- roh . . .	-	24	80,4	66,4	146,8	346,0	199,2
4a.	Casein, gekocht . .	-	24	38,8	66,4	105,2	195,0	89,8
4b.	- roh	-	24	166,4	66,4	232,8	327,0	94,2
5a.	Milch, gekocht . .	-	24	28,0	66,4	94,4	212,0	117,6
5b.	- roh	-	24	36,8	66,4	103,2	212,8	109,6
6a.	Serum, gekocht . .	-	24	24,8	66,4	91,2	107,0	15,8
6b.	- roh	-	24	24,8	66,4	91,2	86,8	—
7a.	Eiereiweiß, gekocht	-	24	19,6	66,4	86,0	94,8	?
7b.	- roh . .	-	24	(19,6)	66,4	(86,0)	88,0	—

Pflanzeneiweißpräparate neben dem des eigenen Hafereiweißes in Lösung zu bringen. Beim Roborat konnte ein Angriff konstatiert werden, wenn es gekocht und wenn es roh zugesetzt wurde, beim Lactagol nur, wenn es gekocht worden war; das findet wohl darin seine Erklärung, daß das Lactagol sich ungekocht kaum in Wasser löst und so rein mechanisch dem Ferment eine nur geringe Angriffsmöglichkeit bietet. Es fragt sich nun weiter, wie sich unser Ferment tierischen Eiweißkörpern gegenüber verhält. Beginnen wir mit dem Casein, das im allgemeinen leicht und schnell von proteolytischen Fermenten angegriffen wird. Die Versuche 3, 4, 5 der Tabelle 10 zeigen, daß das Haferferment einen großen Teil des vorhandenen koagulablen N der Milch sowie zweier Casein-

*) Gesamt-N in 10 g resp. 10 ccm.

präparate „Casein“ und „Plasmon“ (Caseinnatrium) in lösliche N-Verbindung überzuführen vermag. Diese so durch das Ferment von dem zugesetzten Eiweiß verdauten Mengen sind beim Plasmon sogar sechsmal so groß als die aus dem Hafereiweiß, in dem das Ferment enthalten ist, überhaupt lösbaren, ein Zeichen, wie leicht gerade das Casein auch für das Haferferment verdaulich ist. Ob die Milch und die Lösungen der Caseinpräparate vor dem Versuche erst gekocht wurden oder nicht, ist ohne nennenswerten Einfluß auf die Größe des Angriffes durch das Ferment. Dagegen verlohnt sich vielleicht der Hinweis darauf, daß die Menge des durch Mastix fällbaren N in den gekochten Proben der Milch, des Caseins und des Plasmons übereinstimmend höher resp. die des löslichen N geringer gefunden wurde als in den entsprechenden ungekochten Proben. Es müssen also durch das Kochen N-haltige Körper niedergeschlagen worden sein, die bei der Mastixfällung allein der Koagulation entgehen*); für unsere Fragestellung dürfte das wohl ohne Belang sein.

Trotz dieser auffällig intensiven Wirkung, welche das Haferferment gegenüber dem Casein entfaltet, erwies es sich nun gegen die weiterhin untersuchten tierischen Eiweißstoffe (Pferdeserum und Eiereiweiß) gar nicht oder nur sehr wenig wirksam. Eiereiweiß wurde weder roh noch gekocht von dem Haferferment in erkennbarer Weise angegriffen, und auch gegenüber dem rohen Pferdeserum wurde kein proteolytischer Effekt beobachtet. Dagegen war ein geringer, aber deutlicher Angriff des gekochten Serums zu konstatieren. Also auch hier erweist sich das Pferdeserum wieder für ein proteolytisches Ferment wie für das Trypsin in rohem Zustande erheblich schwerer angreifbar als in gekochtem. Da es sich in diesem Falle um ein Ferment handelt, das in seinen sonstigen Eigenschaften dem Trypsin gar nicht ähnelt, so darf diese Tatsache vielleicht als eine Bestätigung für die Richtigkeit der von Oppenheimer und Aron**) schon früher ausgesprochenen Ansicht betrachtet werden, daß das Leichterverdaulichwerden des Serumeiweißes nach dem Erhitzen wahrscheinlich mehr auf eine Änderung des molekularen Aufbaues als auf die Zerstörung einer spezifisch antitryptischen Funktion zurückzuführen ist.

---

*) Es ist ja auch bekannt, daß aus gekochter Milch beim Ansäuern mit Essigsäure alles Eiweiß gefällt wird, aus roher Milch das Albumin aber nicht.

**) Oppenheimer und Aron, l. c.

Vielleicht darf an dieser Stelle noch kurz eine fast resultatlos verlaufene, aber doch ganz lehrreiche Versuchsreihe angeführt werden.

Tabelle 11.

Fremdes Eiweiß 10 g resp. 50 ccm	Reaktion	Zeit Stdn.	Lösl. Stickstoff im fremden Eiweiß und Hafer. Enzym getötet! mg	Durch das Enzym gelöster Stickstoff im Hafer mg	Summa d. lösl. Stickstoffes mg	Gefundener löslicher Stickstoff	Also vom zugesetzten fremden Eiweiß durch das Haferenzym gelöst
Serum, roh .	0,8 % HCl	24	252,0	30,4	282,4	283,2	—
Plasmon, roh	0,6 % -	24	161,76	38,8	200,56	192,56	—
Lactagol, roh	0,5 % -	24	221,6	32,8	254,4	258,4	—
Roborat, roh	0,5 % -	24	251,6	32,8	284,4	276,8	—

Ein Teil der in der Tabelle 10 aufgeführten Versuche wurde auch in saurer Lösung angesetzt und diese Versuche wie üblich am Schlusse zum Töten des Fermentes gekocht. Bei dieser Anordnung ergab sich nun, wie Tabelle 11 zeigt, scheinbar gar kein Angriff der verschiedenen Eiweikßörper durch das Haferferment. Der vorhandene, von vornherein lösliche N ist aber, wie ein Vergleich der Tabellen 10 und 11 zeigt, erheblich größer als der in neutraler Lösung gefundene. Es hat also das halbstündige Kochen mit 0,5% Salzsäure genügt, um ebensoviel, ja noch mehr N aus den Eiweißpräparaten abzuspalten, als das Ferment selbst löst. Aber — und diesen Schluß gestattet wenigstens die im übrigen ergebnislose Versuchsreihe — auf den von der schwachen Salzsäure nicht angegriffenen N-haltigen Rest hat auch das Ferment keine Wirkung ausgeübt; es sind also wahrscheinlich gerade die leicht abspaltbaren Gruppen dieser Eiweißkörper, die das Ferment anzugreifen vermag, während der resistentere Rest seiner Wirkung widersteht, wie das ja ganz analog für das eigene Hafereiweiß schon konstatiert wurde.

Diese Versuchsreihen lehren uns also, daß das im Hafer enthaltene proteolytische Ferment eine ganze Reihe von Eiweißstoffen, in erster Linie das Casein, dann aber weiter auch einige pflanzliche Eiweißstoffe anzugreifen vermag. Dagegen sind Eiereiweiß und Serumeiweiß — letzteres wenigstens in rohem Zustande — dem Ferment gegenüber resistent. Daß Bergman (l. c.) also für sein proteolytisches Heuferment keine fibrinverdauende Wirkung feststellen konnte, erscheint hiernach ganz verständlich. Um

eine ausgesprochene Spezifität des Fermentes für bestimmte Eiweißkörper dürfte es sich hier wohl nicht handeln. Die Unterschiede sind mehr quantitativer als qualitativer Natur. Da die tierischen Eiweißkörper außer dem Casein im allgemeinen für Fermente schwerer angreifbar sind, so versagt die Wirkung unseres Fermentes, das ja wie überhaupt die pflanzlichen, proteolytischen Fermente an Wirkungsfähigkeit den tierischen bedeutend nachsteht, diesen Stoffen gegenüber fast gänzlich.

Darstellung eines Glyzerinextraktes.

Bei den bisherigen Versuchen wirkte das Ferment immer in der Haferlösung, es mußte also außer auf die zur Verdauung zugesetzten Eiweißkörper auch noch auf das vorhandene Hafereiweiß selbst wirken. Es wurden deshalb noch einige Versuche angeschlossen, das Ferment zu isolieren, schon um dadurch die von Bergman (l. c.) ausgesprochene Ansicht, es werde sich bei den Pflanzenfermenten wahrscheinlich nur um intrazellulär wirksame Fermente handeln, endgültig zu widerlegen. Geschrotener Hafer (Hafermehl erwies sich weniger günstig) wurde 10 bis 12 Stunden in der Kugelmühle in einem Gemische gleicher Teile Wasser und Glyzerin gründlich zermahlen, der feste Rückstand in einer Filterpresse abgepreßt und das ablaufende Filtrat in hohen Zylindern durch Sedimentieren geklärt. Die dann abgeheberte, braungelbe Flüssigkeit wurde schließlich noch mehrmals filtriert.

Der so gewonnene Glyzerinextrakt erwies sich auch nach wochenlanger Aufbewahrung im Eisschranke proteolytisch wirksam gegenüber den Eiweißkörpern, die schon in den vorhergehenden Versuchen für das Ferment angreifbar gefunden wurden (Tabelle 12).

Daß der Versuch 3 der Tabelle 12 keinen Angriff des Roborats erkennen läßt, muß wohl auf Verwendung von zu wenig Ferment beruhen, da bei Zusatz der doppelten Extraktmenge (Versuch 6) auch bei diesem Eiweißkörper ein positives Resultat erzielt wurde. Es wurde schließlich noch das im Glyzerinextrakt vorhandene Ferment einer Haferlösung mit wirkendem Fermente zugesetzt. Der Gedankengang, der mich zu dieser Versuchsanordnung veranlaßte, war folgender: Schon aus mehreren Gründen wurde die Ansicht vertreten, daß das proteolytische Haferferment deshalb nur einen bestimmten Teil des Hafereiweißes in Lösung bringt, weil der übrigbleibende Rest für das Ferment nicht angreifbar ist. Ist diese Auffassung richtig, so darf auch eine Vermehrung der Fermentmenge, d. h. Zusatz eines auf Hafereiweiß und andere Eiweißkörper proteolytisch wirkenden Extraktes zu einer Lösung rohen Hafers keine Vermehrung der durch Verdauung gelösten N-Mengen hervorrufen. Die Versuche 8 und 9 haben auch tatsächlich dieses Ergebnis geliefert, also ein dritter Beweis für die Richtigkeit der vorhin ausgesprochenen Ansicht.

Tabelle 12.

30 g des betreffenden Futtermittels, resp. 10 g vom Präparat.

	Futtermittel	Extrakt	Reaktion	Zeit	Löslicher Stickstoff im Eiweiß	Löslicher Stickstoff im Extrakt	Summa des löslichen Stickstoffes	Gefundener löslicher Stickstoff	Also durch Glyzerinextrakt verdaut
				Std.	mg	mg	mg	mg	mg
1.	Hafer, gekocht	50 ccm I	Neutral	24	38,0	16,8	54,8	63,16	8,36
2.	Wicken, gekocht	50 ccm I	-	24	174,4	16,8	191,2	212,0	20,8
3.	Roborat, gekocht	50 ccm I	-	24	94,4	16,8	111,2	103,04	—
4	Gerste, gekocht	50 ccm II	-	24	35,2	23,1	58,3	76,4	18,1
5.	Hafer, gekocht	50 ccm II	-	24	38,0	23,1	61,1	72,8	11,7
6.	Roborat, gekocht	100 ccm II	-	24	94,4	23,1	117,5	145,6	28,1
7.	Plasmon, roh . .	100 ccm III	-	24	80,4	16,8	97,2	247,4	150,2
8.	Hafer, roh . .	50 ccm III	Neutral	24	66,4	16,8	83,2	77,8	—
9.	Hafer, roh . .	50 ccm IV*)	-	24	66,4	28,0	94,4	95,0	—

Einige weitere Versuche stellte ich derartig an, daß ich Glyzerinextrakt in steigenden Mengen auf ein bestimmtes Quantum Milch einwirken ließ. Eine Gerinnung der Milch, wie sie durch das Labferment im Magen hervorgerufen wird, konnte nirgends beobachtet werden.

Ergebnisse.

Aus meinen Untersuchungen ergibt sich demnach:

I. Das Vorkommen proteolytischer Fermente in Hafer, Gerste und Wicken wird bestätigt. Das proteolytische Ferment des Hafers, das auch in Form eines Glyzerinextraktes isoliert werden konnte, ist am wirksamsten in saurer Lösung, weniger in neutraler, sehr viel schwächer in alkalischer. Der Endpunkt der Verdauung wird meist sehr schnell erreicht; nach 24 Stunden ist nicht mehr gelöst als schon nach 6 Stunden.

*) Wirksamkeit sichergestellt.

II. Bei der Einwirkung des Pepsins und des Trypsins auf Hafer wird infolge der Mitwirkung des proteolytischen Haferenzymes der Hafer weitaus schneller und besonders bei geringen Pepsinmengen auch tiefer gespalten als der gleiche Hafer, in dem das Ferment durch Kochen getötet ist. Durch das proteolytische Enzym wird von dem eigenen Pflanzeneiweiß und ebenso von anderen Eiweißkörpern stets nur ein Teil des vorhandenen N in lösliche Verbindung übergeführt, obgleich noch erhebliche Mengen wirkungsfähigen Fermentes vorhanden sind. Da auch weiterer Zusatz von Ferment den Grad des Angriffes nicht erhöht, so erscheint die Anschauung begründet, daß das Haferenzym nur ganz bestimmte Gruppen des Eiweißmoleküls abzuspalten vermag, und zwar, wie aus einer anderen Versuchsreihe hervorgeht, gerade die auch durch Kochen mit verdünnten Säuren leicht abzuspaltenden N-haltigen Gruppen.

III. Das Ferment greift außer dem Hafereiweiß sehr leicht das Eiweiß der Milch in verschiedener Form an, ebenso eine Reihe pflanzlicher Eiweißkörper (Gersteneiweiß, Wickeneiweiß, Roborat, Lactagol), dagegen nur sehr schwer andere tierische Eiweißkörper, Eiereiweiß gar nicht, Serumeiweiß nur nach dem Kochen.

Amylolytische Pflanzenfermente.

Gleich interessant, aber großartiger in ihren Wirkungen und daher wichtiger als die proteolytischen Pflanzenfermente sind die amylolytischen Pflanzenenzyme.

Ihre wichtigste Rolle spielen diese Fermente ohne Frage in der keimenden Gerste (Bierbereitung!). Payen und Persoz (46) und v. Gorup-Besanez (47) fanden auch in anderen keimenden Samen, so im Hafer, Weizen, Mais, Reis, in Kartoffelknollen, Wicken usw. solche Fermente. In ruhenden Samen, jedoch spärlicher, fand Kjeldahl (48), in Kieferpollen Erlenmeyer (49) und in den Knospen von Ailanthus glandulosa fanden Payen und Persoz (46) amylolytische Fermente. Weiter fand sie Hansen (50) im Milchsafte von Ficus carica. Baranetzki (51) untersuchte die pflanzlichen Organe und Säfte auf saccharifizierende Enzyme hin und fand sie weit verbreitet in Samen, Knollen, Blättern, Wurzeln usw. In der Zuckerrübe (Beta vulgaris) entdeckte Gonnermann (52) amylolytische Fermente.

Wahrscheinlich enthalten nicht alle stärkehaltigen Pflanzenteile die Diastase. So konnte sie Krauch (53) z. B. in Zwiebeln und in den Vegetationsorganen der Birken nicht nachweisen.

In Kryptogamen hat zuerst Kosmann (54) saccharifizierende Fermente gefunden (Algen, Pilze usw.). In Aspergillus niger fand sie Duclaux (55), in der Lohblüte (Fuligo septica) Wortmann (56).

Das Vorkommen diastatischer Fermente in Hefeinfusen ist für die Technik von großer Wichtigkeit.

Auch Mucorarten enthalten, wie Gayon und Dubourg (57) nachgewiesen haben, Diastase. Andere Schimmelpilze hat Schäffer (58) untersucht.

Auch aus Bakterien sind diastatische Fermente isoliert worden. So haben Fermente gefunden in Choleravibrionen Bitter (59), in Bacillus mesentericus vulgatus Vignal (60) usw.

Wohl fast alle Mikroorganismen haben die Fähigkeit, Stärke zu lösen. Von Fermi (61) ist der definitive Nachweis geführt worden, daß hier nicht vitale, sondern enzymatische Prozesse vorliegen.

Die Frage, ob nun diese in Pflanzen vorkommenden saccharifizierenden Fermente auch im Verdauungstraktus der Pflanzenfresser eine Rolle spielen, ist zuerst von Ellenberger und seinen Mitarbeitern (62) angeschnitten worden. Goldschmidt (62) beweist durch seine Versuche, daß in der Luft Pilze sind, die die Wirkung des Speichels erhöhen. Dadurch ist aber die Frage nach der Ursache der bedeutenden Amylolyse, die durch die Speicheldiastase allein nicht zu erklären ist, nur zum Teil gelöst.

In weiterer Folge stellte nun Hofmeister Versuche mit Hafer an und wies ein Ferment im Hafer nach, das als ursächliches Moment bei der Magenverdauung der Stärke in Betracht zu ziehen ist.

So haben Ellenberger und seine Schüler durch ihre Versuche gezeigt, daß mindestens ein Ferment, das Stärke in Dextrin, Zucker usw. umwandeln kann, im Hafer vorhanden ist. Das Hauptmoment bei der Arbeit war jedoch ein anderes. Denn Ellenberger (63) betont zum Schluß, „daß es uns bei unserer Mitteilung nicht darauf ankam, das Vorkommen von Fermenten in den Nahrungsmitteln, eine längst bekannte Tatsache, zu be-

weisen, sondern daß wir nur und allein konstatieren wollten, daß die Fermente bei Ablauf der Verdauungsvorgänge im Verdauungskanal der Haustiere wesentlich in Betracht kommen, und daß ein Teil dieser Vorgänge nicht auf Rechnung der im Tierkörper gebildeten, sondern auf Rechnung der von außen mit den Nahrungsmitteln und der Luft eindringenden Fermente zu setzen ist."

Weitere Arbeiten (64) dieser Forscher ergaben als Hauptresultat, daß „mindestens drei Fermente, ein amylolytisches, ein proteolytisches und ein Milchsäureferment wirksam sind, daß diese dem Hafer anhaftenden Fermente durch Kochhitze zerstört werden, daß sie dagegen im lebenden Magen unserer Haustiere unter den dort gegebenen Bedingungen wirksam bleiben, und daß sie demnach wesentliche Faktoren bei der Magenverdauung derjenigen Tiere darstellen, welche ungekochte Nahrungsmittel genießen. Am mächtigsten wirkt zweifellos das Stärkeferment."

Ferner stellt Ellenberger fest, daß eine 0,2 prozentige Salzsäure die Wirkung aller drei Fermente beinahe aufhebt.

Hofmeister (65) kombiniert seine Versuche so, daß er gleichzeitig bemüht ist, das Temperaturoptimum für die Fermente festzustellen. Er untersuchte eine Reihe von Nahrungsmitteln: Rohe Kartoffeln, Reismehl, Erbsen-, Gersten-, Weizen-, Roggen-, Hafer-, Maismehl, Roggenstroh und Wiesenheu und wies nach, daß sich in sämtlichen untersuchten pflanzlichen Nahrungsmitteln ein amylolytisches Ferment, wenn auch von verschieden kräftiger Wirkung, befindet.

Die Fermente sind am wirksamsten bei einer Temperatur von 39—40 Grad C und nicht erst, wie man früher glaubte, bei 65—69 Grad C. Nur beim Weizen und Roggen liegt das Optimum der Wirkung bei hoher Temperatur.

In Fortsetzung der Arbeiten der letztgenannten Autoren haben dann Scheunert und Grimmer (66) das Vorkommen zuckerbildender Nahrungsmittelenzyme im Mais, Hafer, in Pferdebohnen, Lupinen, Buchweizen, Wicken festgestellt und die Wirksamkeit dieser Enzyme unter den den physiologischen Verhältnissen im Magen und Dünndarm der Haussäugetiere entsprechenden Bedingungen näher untersucht.

Während bei neutraler und alkalischer Reaktion alle Fermente wirksam sind, zeigt sich, daß „das im Hafer, Mais und Buch-

weizen enthaltene amylolytische Enzym offenbar durch eine Konzentration von 0,2 % H Cl wirkungslos gemacht wird".

„Das amylolytische Enzym der Pferdebohnen, Lupinenkörner und der Wicke hingegen verliert hierbei seine Wirksamkeit nicht, sondern behält dieselbe, wenn auch in geringerem Maße, bei."

Von Interesse erschien es mir, die Wirkungsweise des Fermentes weniger vom praktischen als mehr vom theoretischen Standpunkt zu untersuchen, d.h. festzustellen, in welcher Weise die Temperatur, die Zeitdauer und die Fermentmenge die Wirkung des Fermentes beeinflussen.

Da sich der aus Hafer dargestellte Glyzerinextrakt nicht allein proteolytisch, sondern auch amylolytisch als sehr wirksam erwies, wurde er ausschließlich zu den folgenden Untersuchungen verwendet. Er zeigte sich auch nach wochenlanger Aufbewahrung im Eisschranke amylolytisch wirksam gegen Stärkelösung.

Die Frage nach dem Temperaturoptimum war schon durch Hofmeister (67) untersucht worden. Hofmeister studierte die Wirkung des Fermentes bei 16 bis 18 Grad, 39 bis 40 Grad, 50 bis 60 Grad und 60 bis 75 Grad. Höher hinauf ging er nicht. Er fand, daß das Optimum der Wirkung bei Körpertemperatur liegt.

Die Frage nach dem Einfluß von Zeit und Fermentmenge war insofern von Interesse, als unsere Kenntnisse von dem Einfluß dieser beiden Faktoren auf die Fermente noch keineswegs sichere sind. — So behaupten z. B. beim Trypsin die einen Forscher (Vernon (68), Oppenheimer und Aron (69)), dieses folge dem sog. Schütz-Borissowschen Gesetze (70), andere (Volhard (71), Löhlein (72), Groß (73)) wieder, es folge ihm nicht. Es schien mir daher der Mühe wert, zu untersuchen, diese Frage für die Nahrungsmittelfermente zu lösen.

Um zu erkennen, ob das Enzym in dem Glyzerinextrakt überhaupt auf Stärke einwirkt, stellte ich folgenden Versuch an: Zwei Erlenmeyerkolben A und B mit je 100 ccm einer 10 prozentigen Stärkelösung wurden mit 150 ccm Extrakt versetzt. A wurde ½ Stunde im Wasserbade erhitzt, B dagegen blieb ungekocht; das Enzym konnte also in B seine volle Wirksamkeit entfalten. Beide Kolben verblieben 24 Stunden im Brutschranke, der eine Temperatur von 39 Grad besaß. Nach dem Herausnehmen wurde auch in B das Enzym durch ½ stündiges Kochen getötet, und

dann wurde, wie vor dem Einstellen in A, jetzt auch in B das Volumen wieder auf 250 ccm gebracht. Der Inhalt beider Kolben wurde dann mit essigsaurem Blei gefällt, mit Kaolin durchschüttelt (74) und durch Wattebausche abfiltriert. Die Wattebauschen wurden dazu mit einem Glasstabe fest in den Trichter hineingepreßt. Polarimetrisch stellte ich dann fest, daß das Filtrat B eine um 1,7 Grad stärkere Drehung zeigte als das Filtrat A. Also hatte tatsächlich das im Glyzerinextrakt enthaltene Enzym einen Teil der Stärke in Zucker verwandelt.

Bei meinen folgenden Versuchen bediente ich mich einer viel einfacheren

Methodik,

indem ich das Prinzip der in jüngster Zeit von W o h l g e m u t h (75) beschriebenen Methode anwandte.

Zur Herstellung der Stärkelösung benutzte ich die „lösliche Stärke" von K a h l b a u m. 5 g Stärke wurden in etwas kaltem destillierten Wasser gelöst und darin verrührt, bis sich eine gleichmäßige Suspension gebildet hatte, und diese Masse dann unter Umrühren in ein Gefäß mit kochendem Wasser gegossen. Nach Abspülen der Gefäße usw. und Erkaltenlassen der Flüssigkeit wurde diese in einen Maßkolben gespült, mit kaltem destillierten Wasser nachgespült und die Flüssigkeit auf 500 ccm aufgefüllt. So erhielt ich eine 1 prozentige Stärkelösung, die sich bei Zusatz von etwas Thymol längere Zeit hielt. Trotzdem habe ich aus Zweckmäßigkeitsgründen immer wieder von Zeit zu Zeit frische Lösungen hergestellt.

Der **Gang der Untersuchung** gestaltete sich folgendermaßen:

Eine bestimmte Anzahl von Reagenzgläsern wurde mit je 1 ccm Stärkelösung und mit ansteigenden Mengen des Glyzerinextraktes beschickt. Dann wurden sämtliche Gläser mit einer Mischung von gleichen Teilen Glyzerin und Wasser auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und schließlich in ein Gefäß mitf kaltem Wasser gestellt. Die Anwendung des kalten Wassers sollte eine vorzeitige Fermentwirkung verhindern. Dann kamen die Röhrchen gleichzeitig in ein Wasserbad von bestimmter Temperatur und verblieben darin eine festgesetzte Zeit. Nach dem Herausnehmen kamen sie wieder alle in kaltes Wasser, so daß die Fermentwirkung überall gleichmäßig kupiert wurde. Nach dem Abkühlen kam in jedes Gläschen die gleiche Anzahl von Tropfen einer $^1/_{10}$-Normal-Jodlösung, dann wurde umgeschüttelt. Hierauf wurde der „limes", d. h. die unterste Grenze der Wirksamkeit, bestimmt. Diejenigen Gläschen, die keinen blauen Farbenton zeigten, wurden als „verdaut" betrachtet.

Abweichend von der W o h l g e m u t h schen Methode habe ich meine Gläschen nicht nach dem Herausnehmen, sondern

vor dem Einführen in das Wasserbad auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Dies erwies sich bei den größeren Mengenverhältnissen meiner Fermentlösung als geeigneter.

Es wurde aber, wie schon angedeutet, nur das Prinzip der Wohlgemuthschen Methode benutzt. Die Versuche wurden stets so arrangiert, daß der Punkt bestimmt wurde, bei dem eine gleiche Menge Stärke (1 ccm der 1 prozentigen Lösung) in gleicher Konzentration verdaut worden war. An Stelle einer „Tüpfelprobe" erwies sich das von Wohlgemuth vorgeschlagene Verfahren als sehr bequem.

Sämtliche Versuche wurden in neutraler Reaktion vorgenommen; denn Scheunert und Grimmer (76) haben durch ihre Untersuchungen gezeigt, daß das Ferment des Hafers auch bei alkalischer Reaktion wirksam, bei saurer dagegen unwirksam ist. Ein Versuch nach dieser Richtung hin erschien mir daher nicht notwendig.

Untersuchungsresultate.

Zuerst mußte ich feststellen, ob die Methode Wohlgemuths auch für mein Ferment anwendbar ist. Denn z. B. die Methode von Groß*) zur Bestimmung der Wirksamkeit des Trypsins, die im Prinzip darauf beruht, daß nach einer bestimmten Zeit das gesamte zugesetzte Eiweiß durch das Ferment verdaut ist, konnte, wie diesbezügliche Versuche zeigten, für das proteolytische Ferment des Hafers keine Anwendung finden, da dieses Ferment nur einen Teil vom zugesetzten Eiweiß verdaut, also niemals vollkommene Verdauung erreicht wird.

Der Vorversuch gestaltete sich folgendermaßen:

Tabelle 1.

Glas Nr.	Zeit	Stärkelösung (1 proz.)	Extraktmenge	Glyzerin und Wasser	Bemerkungen
1	1 Std.	1 ccm	4 ccm	11 ccm	blau
2	1 -	1 -	5 -	10 -	blau
3	1 -	1 -	6 -	9 -	blauviolett
4	1 -	1 -	7 -	8 -	violett
5	1 -	1 -	8 -	7 -	limes
6	1 -	1 -	9 -	6 -	gelbrot
7	1 -	1 -	10 -	5 -	-
8	1 -	1 -	11 -	4 -	-

*) Groß, loc. cit.

Aus diesem Versuche ergibt sich, daß 8 ccm der angewandten Fermentlösung nach 1 Stunde 1 ccm Stärkelösung (1 prozentig) völlig verdaut haben. Die Wohlgemuthsche Methode liefert also auch bei dem saccharifizierenden Fermente des Hafers scharfe Umschläge.

Um zu erfahren, ob es von Bedeutung ist, daß man auf ein bestimmtes Volumen auffüllt, setzte ich einen weiteren Versuch an (Tabelle 2), der mit dem vorhergehenden genau übereinstimmte, nur wurde nicht mit Glyzerinwasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt.

Tabelle 2.

Glas Nr.	Zeit	Stärkelösung	Extraktmenge	Bemerkungen
1	1 Std.	1 ccm	4 ccm	blau
2	1 -	1 -	5 -	blau
2	1 -	1 -	6 -	blauviolett
4	1 -	1 -	7 -	violett
5	1 -	1 -	8 -	limes
6	1 -	1 -	9 -	gelbrot
7	1 -	1 -	10 -	-
8	1 -	1 -	11	-

Ein Blick auf beide Tabellen zeigt uns, daß es für die Bestimmung des limes gleichgültig ist, ob man auffüllt oder nicht; das Enzym ist stets gleich wirksam. Trotzdem habe ich bei allen Versuchen später auf 16 ccm aufgefüllt, weil es bei der Beurteilung des Farbentones von Bedeutung ist, stets die gleiche Konzentration zu haben.

Da pflanzliche Fermente oft bei sehr hohen Temperaturen besonders wirksam werden (Papayotin (77)), war es meine fernere Aufgabe, die Wirksamkeit des Fermentes bei verschiedenen Temperaturgraden kennen zu lernen.

Der Extrakt selbst, der im Eisschranke bei einer Temperatur von 4—6 Grad C gewonnen wurde, war fast zuckerfrei. Das Enzym war also bei dieser Temperatur noch unwirksam.

Ein anderer Extrakt, der bei Zimmertemperatur aus Hafermehl hergestellt wurde, wies große Mengen Zucker auf. Da der Hafer für gewöhnlich nur Spuren von Zucker enthält (78), so ist dies ein Beweis dafür, daß das Enzym schon bei Zimmertemperatur, also bei etwa 15 bis 20 Grad, wirksam ist. Es wurde

dann durch je eine Versuchsreihe nach dem Schema, das Tabelle 3 zeigt, festgestellt, welche Extraktmengen erforderlich sind, um bei 25°, 30°, 35°, 40°, 45°, 50°, 60°, 70°, 75°, 80°, 85°, 90°, 95° und 100° die gleiche Menge (1 ccm) Stärkelösung vollständig zu verdauen.

Tabelle 3.

Glas Nr.	Zeit	Stärkelösung (1 proz.)	Extrakt-menge	Glyzerin und Wasser zu gleichen Teilen
1	1 Std.	1 ccm	1 ccm	14 ccm
2	1 -	1 -	2 -	13 -
3	1 -	1 -	3 -	12 -
4	1 -	1 -	4 -	11 -
5	1 -	1 -	5 -	10 -
6	1 -	1 -	6 -	9 -
7	1 -	1 -	7 -	8 -
8	1 -	1 -	8 -	7 -
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
12	1 -	.	12 -	3 -
13	1 -	1 -	13 -	2
14	1 -	1 -	14 -	1 -
15	1 -	1 -	15 -	—

Die folgende Temperaturkurve gibt das Resultat dieser Versuche in übersichtlicher Form wieder:

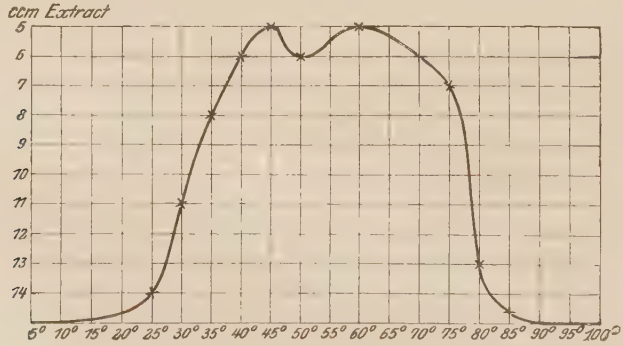

Fig. 1.

In der Figur geben die Zahlen auf der Abszisse die Temperaturgrade, die Zahlen auf der Ordinate dagegen die Kubikzentimeter an, welche erforderlich sind, um bei der betreffenden Temperatur völlige Verdauung herbeizuführen. Die Sterne bedeuten die durch die einzelnen Versuche festgestellten „limes"-Werte.

Die Temperaturkurve beginnt von 25° an rasch zu steigen und erreicht ihren Höhepunkt bei 45°, bleibt bis 75° etwa auf derselben Höhe und fällt dann wieder rasch. Bei 80° ist noch eine deutliche Wirksamkeit des Enzyms vorhanden, bei 85° ist dieselbe sehr gering (die letzten Gläser der Versuchsreihe waren etwas angedaut), verschwindet immer mehr und ist bei 90 bis 95° gleich Null.

Es ergibt sich demnach:

I. Das Optimum der Fermentwirkung liegt zwischen 40° und 70°.

II. Das Ferment hält hohe Temperaturgrade aus, ohne geschwächt zu werden; erst beim Erhitzen auf 90 bis 95° wird es vollkommen getötet.

Meine zweite Aufgabe war es nun, über die Beziehung, die zwischen Zeitdauer und Fermentmenge besteht, etwas zu erfahren. Mit anderen Worten, ich versuchte festzustellen, ob das Ferment bei seiner Wirksamkeit dem sog. Schütz-Borissowschen Gesetze (79) folge oder nicht. Das Gesetz besagt bekanntlich, daß die Mengen der Verdauungsprodukte — in diesem Falle die Mengen des gebildeten Zuckers, Dextrins usw. — einerseits den Fermentmengen, andererseits den Quadratwurzeln aus den Zeiten proportional sind.

Versuchsanordnung.

Ich habe meine Versuche so arrangiert, daß ich bei steigenden Zeiten diejenige Fermentmenge festgestellt habe, welche notwendig ist, eine gegebene Menge Stärke vollkommen zu verdauen; mit anderen Worten, es wurde untersucht, wie derselbe Effekt bei steigenden Fermentmengen und fallenden Zeiten resp. bei fallenden Fermentmengen und steigenden Zeiten erreicht wird. Sämtliche Versuche wurden bei einer Temperatur von 39 bis 40° ausgeführt.

Zunächst wurde mit Fermentmengen um je 2 ccm ansteigend (s. Tabelle 4) festgestellt, innerhalb welcher Grenzwerte der zu erwartende Wert liegen mußte. Dann wurde durch einen zweiten Versuch der Wert zwischen den so ermittelten Grenzwerten, z. B. zwischen 5 und 7 ccm, bis auf ½ ccm beschränkt (vgl. Tabelle 5) und schließlich, nachdem so die Grenze bis auf ½ ccm gezogen

worden war, der „limes“ durch eine dritte Versuchsreihe bis auf $^1/_{10}$ ccm genau bestimmt (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 4.

Glas Nr.	Stärkelösung (1 proz.)	Extraktmenge	Glyzerin und Wasser zu gleichen Teilen
1	1 ccm	1 ccm	14 ccm
2	1 -	3 -	12 -
3	1 -	5 -	10 -
4	1 -	7 -	8
5	1 -	9 -	6
6	1	11 -	4
7	1 -	13 -	2
8	1 -	15 -	—

Tabelle 5.

Glas Nr.	Stärkelösung	Extraktmenge	Glyzerin und Wasser zu gleichen Teilen
1	1 ccm	5 ccm	10 ccm
2	1 -	$5^1/_2$ -	$9^1/_2$ -
3	1 -	6 -	9 -
4	1 -	$6^1/_2$ -	$8^1/_2$ -
5	1 -	7 -	8 -

Tabelle 6.

Glas Nr.	Stärkelösung	Extraktmenge	Glyzerin und Wasser zu gleichen Teilen
1	1 ccm	$5^5/_{10}$ ccm	$9^5/_{10}$ ccm
2	1 -	$5^6/_{10}$ -	$9^4/_{10}$ -
3	1 -	$5^7/_{10}$ -	$9^3/_{10}$ -
4	1 -	$5^8/_{10}$ -	$9^2/_{10}$ -
5	1 -	$5^9/_{10}$ -	$9^1/_{10}$ -
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
9	1 -	$6^3/_{10}$ -	$8^7/_{10}$
10	1 -	$6^4/_{10}$ -	$8^6/_{10}$
11	1 -	$6^5/_{10}$ -	$8^5/_{10}$ -

Versuchsresultate.

Es ergaben sich aus den Versuchen folgende Resultate:

Tabelle 7.

Zeit	Menge des Extraktes, die erforderlich ist, um 1 ccm Stärkelösung (1 proz.) zu verdauen.
$^1/_2$ Stunde	7,3 ccm
1 -	5,3 -
2 Stunden	3,6 -
4 -	2,6 -
8 -	1,8 -

Nehmen wir jetzt als Einheit die Zeit t = $^1/_2$ Stunde und als Einheit der Fermentmenge f = 0,9 ccm Fermentlösung, so müßte sein, wenn das Ferment der Schütz-Borissowschen Regel folgen würde:

$$f \cdot \sqrt{t} = \text{Konst.}$$

Nun ist vollkommene Verdauung erreicht:

Tabelle 8.

Stunden	Zeit Einheiten	Fermentlösung ccm	Fermentmenge Einheiten	$f \cdot \sqrt{t} = C.$
$^1/_2$	1	7,3	8,1	$8{,}1 \cdot \sqrt{1} = 8{,}1$
1	2	5,3	5,9	$5{,}9 \cdot \sqrt{2} = 8{,}3$
2	4	3,6	4	$4 \cdot \sqrt{4} = 8{,}0$
4	8	2,6	2,9	$2{,}9 \cdot \sqrt{8} = 8{,}2$
8	16	1,8	2	$2 \cdot \sqrt{16} = 8{,}0$

Die erhaltenen Konstanten $C = f \cdot \sqrt{t}$ stimmen in allen Versuchen — wie die letzte Kolumne zeigt — gut überein; wir können deshalb wohl ohne Frage schließen, daß das Ferment sehr gut dem Schütz-Borissowschen Gesetze folgt.

Ergebnisse.

1. Das Optimum der Wirkung des in Form eines Glyzerinextraktes dargestellten amylolytischen Haferfermentes liegt zwischen 40 und 70°. Hohen Temperaturen gegenüber ist das

Ferment sehr resistent; erst bei einer Temperatur von 90 bis 95° ist es vollständig wirkungslos.

II. Verdauungsversuche mit Stärke ergeben, daß das Ferment der Schütz-Borissowschen Regel folgt: $f . \sqrt{t} = \text{Konst.}$

Schlußbetrachtungen.

Bei meinen Untersuchungen kam es nicht darauf an, etwa von neuem das Vorhandensein von Enzymen in Pflanzen nachzuweisen, sondern die Bedingungen zu studieren, unter denen die Enzyme beim Verdauungsvorgange ihre größte Wirksamkeit entfalten, ob die Wirkung dieser Enzyme sich neben der der Fermente in den Verdauungssäften überhaupt geltend macht und schließlich, ob die Fermente nur intrazellulär wirken, oder ob sie auch andere Eiweißkörper und bis zu welchem Grade sie diese anzugreifen vermögen.

Es ergibt sich, daß eine Einwirkung auf tierische Eiweißkörper wie Eier- oder Fleischeiweiß usw. mit Sicherheit auszuschlagen ist. Dagegen ist bei der Verdauung pflanzlicher Eiweißkörper eine gewisse Mitwirkung sehr wohl denkbar. Gerade unter den beim Pferde vorliegenden Verhältnissen, die eine möglichst schnelle Verdauung trotz Beimischung geringer Mengen von tierischen Verdauungssäften erheischen, kann die Wirksamkeit der Nahrungsmittelfermente zum Ausdruck kommen. Eins darf man aber bei diesen Überlegungen nicht vergessen, daß nämlich immer nur ein Teil der Eiweißkörper resp. des vorhandenen N gelöst wird, daß aber ein gar nicht so geringer Rest unangegriffen bleibt, der dann die Wirkung der tierischen Verdauungssäfte zur Spaltung beansprucht.

Von besonderer Bedeutung ist das diastatische Ferment, da es Stärke sehr wirksam angreift, restlos spaltet und in seiner Wirkung kräftiger ist als das proteolytische Ferment.

Für die Verdauung des Menschen ist eine Mitwirkung des Haferfermentes, überhaupt der Nahrungsmittelenzyme in den Zerealien, im allgemeinen nicht gerade sehr wahrscheinlich, schon weil wir ja diese Stoffe meist erst nach gründlicher Erhitzung, also Zerstörung der Fermente, genießen. Es sind aber auch in vielen Früchten, die wir wenigstens zum Teil roh essen, ebenfalls proteolytische Fermente vorhanden, und hier könnte an eine Mitwirkung

dieser Fermente gedacht werden. So ist der Gedanke nicht ganz von der Hand zu weisen, daß vielleicht die Wirkung frischer Früchte, deren Genuß ja erfahrungsgemäß die Verdauung befördert, neben anderem auch auf das Vorhandensein solcher oder ähnlicher Fermente zurückzuführen ist.

Am ehesten kann man sich noch nach den Ergebnissen meiner Untersuchungen eine Wirkung, speziell des proteolytischen Haferfermentes, dann denken, wenn es sich um die Verdauung von Milcheiweiß handelt. Bei Zusatz von Hafermehl zur Milch und bei nur gelindem Erhitzen ist eine proteolytische Wirkung der mit dem Hafermehl eingeführten pflanzlichen Fermente auf das Casein gar nicht unwahrscheinlich.

Die pflanzlichen Nahrungsmittelfermente spielen also unter Umständen eine nicht zu unterschätzende Rolle bei den Vorgängen im Digestionstraktus der Herbivoren und vielleicht auch des Menschen.

Dem Herrn Geheimen Regierungsrat Prof. Dr. Munk, der mir die Einrichtungen des Instituts in liebenswürdigster Weise zur Verfügung gestellt hat, sowie dem Herrn Oberstabsveterinär Ludewig, der mir die Anregung zu dieser Arbeit gegeben hat, bin ich zu besonderem Danke verpflichtet und gestatte mir, demselben auch an dieser Stelle Ausdruck zu geben.

Literatur.

1. Zitiert nach Piria, Recherches sur la constitution chimique de l'asparagine et de l'acide aspartique. Annal. de chim. et phys. (III) 22, S. 160.
2. E. Schulze, Landwirtsch. Jahrbücher von Thiel, Untersuchungen über einige chemische Vorgänge bei der Keimung der gelben Lupine (V, 821). — Über einige Produkte der Eiweißzersetzung in Kürbiskeimlingen (VI, 681). — Über den Eiweißumsatz im Pflanzenorganismus (IX, 689).
3. v. Gorup-Besanez, Leucin neben Asparagin in dem frischen Safte der Wickenkeime. Ber. der Deutsch. chem. Ges. VII, 146.
4. v. Gorup-Besanez, Weitere Mitteilungen über das Auftreten von Leucin neben Asparagin während des Keimprozesses der Wicken. Ber. der Deutsch. chem. Ges. VII, 569. — Über das Vorkommen eines diastatischen und peptonbildenden Fermentes in den Wickensamen. Ber. der Deutsch. chem. Ges. VII, 1478. — Weitere Beobachtungen über diastatische und peptonbildende Fermente im Pflanzenreiche, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. VIII, 1510.
5. Green, On the changes in the proteïds in the seed which accompany germination. Phil. Transact. of the Royal Soc. of London 178, 39. — On the germination of the seed of the Castor-Oil-Plant (Ricinus communis). Proc. of the Royal Soc. of London 48, 370.
6. Van der Harst, Fermente in Pilzen. Naturforscher XI, 108.
7. Poehl, Über das Vorkommen und die Bildung des Peptones außerhalb des Verdauungsapparates. Diss. Dorpat 1882. Biol. Zentralbl. III. 252.
8. Neumeister, Über das Vorkommen und die Bedeutung eines eiweißlösenden Enzymes in jugendlichen Pflanzen. Zeitschr. f. Biol. 30, 447.
9. Krauch, Beiträge zur Kenntnis der ungeformten Fermente im Pflanzenreiche. Landwirtsch. Versuchsstat. 23, 78. — Über peptonbildende Fermente in den Pflanzen. Ibidem 27, 303.
10. Green, l. c.
11. Frankfurt, Zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des ruhenden Keimes von Triticum vulgare. Landwirtsch. Versuchsstat. 47, 466.
12. Hansen, Arbeit. a. d. botan. Institut Würzburg III, 281.
13. Zitiert von Green, Ann. of bot. VII, 112. Siehe auch Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig, Verlag von F. C. W. Vogel, 1903, 2. Auflage.
14. Fermi und Buscaglioni, Die proteolytischen Enzyme im Pflanzenreiche. Zentralbl. f. Bakteriol. (II) 5, 125.
15. Soave, Contribut. allo studio della funzione fisiologica dei fermenti della plante. Le stazioni sperimentali agracic. 32, 553.
16. Scheurer-Kestner, Sur un ferment digestif qui se produit pendant la panification. Comptes rendus de l'Académie des sciences 90, 369.
17. Fernbach und Hubert, Sur la diastase protéolytique du malt. Comptes rendus de l'Ac. des sciences 130, 1783.
18. Windisch und Schellhorn, Über das eiweißspaltende Enzym der gekeimten Gerste. Wschr. f. Brauerei XVII, H. 24—29.
19. Weiß, Über die proteolytischen und ein eiweißkoagulierendes Enzym in keimender Gerste. Zeitschr. f. physiol. Chemie 31, 79.
20. Butkewitsch, Über das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in gekeimten Samen und über seine Wirkung. Zeitschr. f. physiol. Chemie 33, 1 (1901).

21. Poehl, l. c.
22. Bourquelot et Herissey, Recherche et présence d'un ferment soluble protéohydrolytique dans les champignons. Comptes rendus de l'Ac. des sciences 127, 666.
23. Hjort, Neue Eiweiß verdauende Enzyme. Zentralbl. für Physiol. X, 192 (1896).
24. Schäffer, Beitr. zur Kenntnis der von einigen Schimmelpilzen hervorgebr. Enzyme. Diss. Erlangen 1900.
25. Die Literatur bei: Flügge, Die Mikroorganismen, 1896. S. 207.
26. Hankin et Wesbroek, Sur les albumoses et les toxalbumines sécrétées par le bacille charbonneux. Annales de l'Institut Pasteur VI, 633.
27. Bitter, Über die Fermentausscheidung des Kochschen Vibrio der Cholera asiatica. Arch. f. Hygiene V, 245.
28. Hüfner, Untersuchungen über ungeformte Fermente und ihre Wirkungen. Journal für prakt. Chemie (Neue Folge), Bd. V, 372.
29. Griffith Hughes, Natural history of Barbadoes. 1750. Bd. VII, S. 181.
30. Browne, Civil and natural hist. of Jamaica 1756, S. 160.
31. Wittmack, Über den Melonenbaum, Carica papaya, besonders über den Blütenbau und die äußerst energische auflösende, fermentartige Wirkung des Milchsaftes auf Eiweißkörper. Sitz.-Ber. der Gesellsch. naturforsch. Freunde, Berlin 1878, 40. Dort die ganze ältere Literatur über Carica papaya.
32. Wittmack, Die pepsinartigen Wirkungen des Milchsaftes von Carica papaya. Vers. der Naturfr. und Ärzte 1879, S. 222.
33. Chittenden, On the proteolytic action of bromelin, the ferment of pine-apple juice. Journ. of Physiol. XV, 249.
34. Ellenberger, Über die Herkunft und die Natur des bei der Magenverdauung wirksamen amylolytischen Fermentes. Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilk. 13, S. 195.
35. Ellenberger und Hofmeister, Das Vorkommen eines proteolytischen und anderer Fermente im Hafer und deren Einwirkung auf die Verdauungsvorgänge. Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilk. 14, 55.
36. Ellenberger, Handbuch der vergleichenden Histologie und Physiologie der Haussäugetiere. Bd. II, Teil I, S. 761 (1890).
37. Scheunert und Grimmer, Zur Kenntnis der in den Nahrungsmitteln enthaltenen Enzyme und ihrer Mitwirkung bei der Verdauung. Zeitschr. für physiol. Chemie 48, S. 27.
38. Weiske, Beeinflussen die in Vegetabilien vorkommenden Fermente die Ausnützung der Nahrung im Organismus? Zeitschr. f. phys. Chemie 19, 282.
39. Bergman, Studien über die Digestion der Pflanzenfresser Skand. Archiv f Physiol 18, 118
40. Hornberger, Landwirtsch. Versuchsstat. 1880, XXIV. Zitiert nach Bergman.
41. Ellenberger, Über die Beeinflussung der Verdauung und der Ausnutzung der vegetabilischen Nahrungsmittel durch die in den Pflanzen vorkommenden Enzyme. Skand. Archiv f. Physiol. 18, 306.
42. Grimmer, Zur Kenntnis der Wirkung der proteolytischen Enzyme der Nahrungsmittel. Biochem. Zeitschrift, Bd. IV, Heft 1, S. 80.
43. Oppenheimer und Aron, Über das Verhalten des genuinen Serums gegen die tryptische Verdauung, Hofmeist. Beiträge 4, 279—99.
44. Michaelis und Rona, Eine Methode zur Entfernung von Kolloiden aus ihren Lösungen, insbesondere zur Enteiweißung von Blutserum. Biochem. Zeitschrift 2, 219.
45. P. Rona und L. Michaelis, Biochemische Zeitschrift 3, 109 und 4, 11. E. Zunz, Arch. int. de Physiol. 5, 245.
46. Payen et Persoz, Mémoire sur la diastase, les principaux produits de sa réaction et leur application aux arts industriels. Ann. de chim. et phys. 53, 73; 56, 337; 60, 441.
47. v. Gorup-Besanez, Über das Vorkommen eines diastatischen und peptonbildenden Fermentes in den Wickensamen. — Weitere Beobachtungen

über diastatische und peptonbildende Fermente im Pflanzenreiche. Ber. der Deutsch. chem. Gesellsch. 7, 1478; 8, 1510.
48. Kjeldahl, Resum. d. Labor. Carlsberg I, 1879; zit. nach Brown und Morris, Journ. of the Chem. Soc. London 57, 505.
49. Erlenmeyer, Über die Fermente in den Bienen, im Bienenbrot, im Pollen und einigen Bestandteilen des Honigs. Münch. akad. Sitz.-Ber. 1874, 204.
50. Hansen, Arbeiten aus dem botanischen Institut Würzburg 3, 271.
51. Baranetzki, Die stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen. Leipzig, 1878.
52. Gonnermann, Ein diastatisches Ferment in der Zuckerrübe (Beta vulgaris var.). Chemiker-Ztg. 1895, 1806.
53. Krauch, Beiträge zur Kenntnis der ungeformten Fermente im Pflanzenreiche. Landwirtsch. Versuchsanstalt 23, 78.
54. Kosmann, Recherches chimiques sur les ferments contenus dans les végétaux et sur les effets produits par l'oxydation du fer sur les matières organiques. Bull. de la société chim. Paris 27, 251.
55. Duclaux, Traité de Chimie biologique, III Bde, S. 142 u. 164.
56. Wortmann, Bildung und Umwandlung der Stärke in den Pflanzenzellen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 6, 324.
57. Gayon et Dubourg, De la fermentation de la dextrine par le mucor. Annales de l'Inst. Pasteur 1, 532.
58. Schäffer, Beitr. z. Kenntnis der von einigen Schimmelpilzen hervorgebrachten Enzyme. Dissert. Erlangen 1900.
59. Bitter, Über die Fermentausscheidung des Kochschen Vibrio der Cholera asiatica. Arch. f. Hyg. 5, 245 (1886).
60. Vignal, z. n. Green. Ann. of bot. 7, 120.
61. Fermi, Beitrag zum Studium der von den Mikroorganismen abgesonderten diastatischen und Inversionsfermente. Zentralbl. f. Bakter. 12, 713; Arch. f. Hyg. 10, 1.
62. Ellenberger, Über die Herkunft und die Natur des bei der Magenverdauung wirksamen amylolytischen Ferments. Arch. f. wiss. u. prakt. Tierh. 13, S. 188.
63. Ellenberger, l. c. S. 195.
64. Ellenberger und V. Hofmeister, Das Vorkommen eines prolytischen und anderer Fermente im Hafer und deren Einwirkung auf die Verdauungsvorgänge. Arch. f. wiss. u. prakt. Tierh. 14, S. 55.
65. Hofmeister, Beitrag zur Frage der Nahrungsmittelfermente. Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilk. 20, S. 23.
66. Scheunert und Grimmer, Zur Kenntnis der in den Nahrungsmitteln enthaltenen Enzyme und ihrer Mitwirkung bei der Verdauung. Zeitschr. für physiol. Chemie 48, S. 27.
67. Hofmeister, l. c.
68. Vernon, Journ. of Physiol. 26, 405, 1901.
69. Oppenheimer und Aron, Beiträge z. chem. Physiol. und Pathol. 4, 279.
70. Huppert und Schütz, Pflügers Archiv 80, 470.
71. Volhard, Münch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 9, 403.
72. Löhlein, Beiträge z. chem. Physiol. und Pathol. 7, 120 bis 143.
73. Groß, Die Wirksamkeit des Trypsins und eine einfache Methode zu ihrer Bestimmung. Arch. f. experim. Pathol. und Pharmakol. 58, S. 157, 1907.
74. Rona und Michaelis, Biochem. Zeitschrift 5, 366, 1907.
75. Wohlgemuth, Über eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des diastatischen Ferments. Biochem. Zeitschrift 9, 1, 1908.
76. Scheunert und Grimmer, l. c.
77. Literatur über Papayotin l. c. Siehe auch Hofmeister, Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilk. 20, 25.
78. Ellenberger, Arch. f. wiss. u. prakt. Tierh. 13, 188.
79. Huppert und Schütz, l. c.

Lebenslauf.

Am 1. Dezember 1885 wurde ich, Paul Klempin, zu Okollo, jetzt Schleusenau, bei Bromberg im Kreise und Regierungsbezirk Bromberg als Sohn des damaligen Eisenbahnbüreau-Assistenten Felix Klempin und seiner Ehefrau Martha, geborene Meyer, geboren. Ich wurde in der Konfession meiner Eltern, der evangelischen, getauft. Im Jahre 1890 wurde mein Vater nach Graudenz versetzt und daselbst zum Eisenbahnsekretär ernannt. Vom 6. Lebensjahre ab besuchte ich die Oberrealschule zu Graudenz und erlangte am 18. Februar 1904 das Zeugnis der Reife. Am 1. Oktober desselben Jahres trat ich als einjährig-freiwilliger Veterinäraspirant beim Feldartillerie-Regiment 71 Groß-Komtur ein und wurde am 1. April 1905 zu einem sechsmonatigen Kursus an der Königlichen Militär-Lehrschmiede Berlin abkommandiert. Nach Bestehen der Prüfung im Hufbeschlage, die am 27. September 1905 stattfand, wurde ich am 1. Oktober 1905 zur Militär-Veterinär-Akademie Berlin übernommen. Am 24. April 1907 bestand ich die naturwissenschaftliche Prüfung und begann hierauf im Physiologischen Laboratorium der Tierärztlichen Hochschule unter Leitung des Geh. Reg.-Rates Herrn Prof. Dr. Munk meine Doktor-Dissertation anzufertigen, die ich ein Jahr später, also Ostern 1908, zum Abschluß brachte.

Nach einer Studienzeit von 7 Semestern bestand ich die tierärztliche Fachprüfung am 7. August 1909. Hierauf wurde ich durch kriegsministerielle Verfügung vom 14. August 1909 zum Unterveterinär im 2. Garde-Feldartillerie-Regiment befördert und gleichzeitig zu einem sechsmonatigen Kursus an der Königlichen Militär-Lehrschmiede Berlin abkommandiert.